

PCT/JP98/00837

17.04.98

日 本 国 特 許 庁

PATENT OFFICE
JAPANESE GOVERNMENT

REC'D 19 JUN 1998

WIPO

PCT

別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されている事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office.

出 願 年 月 日
Date of Application:

1997年 2月27日

出 願 番 号
Application Number:

平成 9年特許願第062290号

出 願 人
Applicant(s):

日本たばこ産業株式会社

BEST AVAILABLE COPY

PRIORITY DOCUMENT

1998年 6月 5日

特許庁長官
Commissioner,
Patent Office

荒井寿光



出証番号 出証特平10-3042474

特平 9-062290

【書類名】 特許願

【整理番号】 J1-802

【提出日】 平成 9年 2月27日

【あて先】 特許庁長官 殿

【発明の名称】 細胞接着タンパク質

【請求項の数】 19

【発明者】

【住所又は居所】 神奈川県横浜市金沢区福浦 1-13-2 日本たばこ産業株式会社 医薬基礎研究所内

【氏名】 玉谷 卓也

【発明者】

【住所又は居所】 神奈川県横浜市金沢区福浦 1-13-2 日本たばこ産業株式会社 医薬基礎研究所内

【氏名】 手塚 克成

【特許出願人】

【識別番号】 000004569

【氏名又は名称】 日本たばこ産業株式会社

【代表者】 水野 勝

【代理人】

【識別番号】 100102978

【弁理士】

【氏名又は名称】 清水 初志

【手数料の表示】

【予納台帳番号】 041092

【納付金額】 21,000円

【提出物件の目録】

【物件名】 明細書 1

【物件名】 図面 1

【物件名】 要約書 1

【書類名】 明細書

【発明の名称】 細胞接着タンパク質

【特許請求の範囲】

【請求項1】 細胞-細胞間若しくは細胞-マトリックス間の接着を仲介する細胞接着タンパク質であって、活性化リンパ球に実質的に発現し、静止期リンパ球には実質的に発現しない細胞接着タンパク質。

【請求項2】 配列番号：2に記載のアミノ酸配列、または配列番号：2に記載のアミノ酸配列中のアミノ酸において1もしくは数個のアミノ酸が置換、欠失もしくは付加されたアミノ酸配列を有する、請求項1に記載の細胞接着タンパク質。

【請求項3】 配列番号：1に記載のDNA配列からなるDNAとハイブリダイズするDNAがコードするタンパク質である、請求項1に記載の細胞接着タンパク質。

【請求項4】 配列番号：2に記載のアミノ酸配列と60%以上の相同性を有する、請求項3に記載の細胞接着タンパク質。

【請求項5】 ヒト由来である、請求項1乃至4に記載の細胞接着タンパク質。

【請求項6】 請求項1乃至5に記載のタンパク質をコードする遺伝子。

【請求項7】 遺伝子がcDNAである、請求項6に記載の遺伝子。

【請求項8】 請求項6または7に記載の遺伝子を含有するベクター。

【請求項9】 請求項8に記載のベクターが導入された形質転換体。

【請求項10】 国際寄託番号 FERM BP-5725である形質転換体。

【請求項11】 請求項1乃至5に記載のタンパク質に反応する抗体またはその一部。

【請求項12】 抗体がモノクローナル抗体である、請求項11に記載の抗体又はその一部。

【請求項13】 モノクローナル抗体が国際寄託番号 FERM BP-5707であるハイブリドーマが産生する抗体である、請求項12に記載の抗体もしくはその一部。

【請求項14】 モノクローナル抗体が国際寄託番号 FERM BP-5708であるハイブリドーマが産生する抗体である、請求項12に記載の抗体もしくはその一部。

【請求項15】 請求項12に記載のモノクローナル抗体を産生するハイブリドーマ。

【請求項16】 国際寄託番号 FERM BP-5707である、請求項15に記載のハイブリドーマ。

【請求項17】 国際寄託番号 FERM BP-5708である、請求項15に記載のハイブリドーマ。

【請求項18】 請求項11乃至14に記載の抗体を含有してなる医薬組成物。

【請求項19】 抗炎症剤である、請求項18に記載の医薬組成物。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】

本発明は、新規な細胞接着タンパク質、該細胞接着タンパク質をコードする遺伝子、該遺伝子を含むベクター、該ベクターが導入された形質転換体、該細胞接着分子に対する抗体、該抗体を産生するハイブリドーマ、該細胞接着タンパク質もしくは該抗体を含有してなる医薬組成物に関する。

【0002】

【従来の技術】

リンパ球は、大別してT細胞とB細胞の2種類に分けられる。骨髄の多能性幹細胞からリンパ球系幹細胞が分化すると、その一部は血流に乗って胸腺に到達する。胸腺で分化成熟したリンパ球はT細胞 (Thymus-derived cell: T cell) と呼ばれ、再び血中に入り全身を巡る。成熟したT細胞はCD3と呼ばれる分子を表面に持っており、この分子を持っていることがその細胞が成熟T細胞であるかどうかを区別する目印になる。CD3は有力なT細胞マーカーである。その他、T細胞はCD4またはCD8などを発現している。T細胞はさらに、Bリンパ球の抗体産生を補助するヘルパーT細胞 (Th細胞: helper T cell)、標的細胞にとりついて直接にそれを

破壊する細胞障害性T細胞（Tc細胞：cytotoxic T cell：CTL）あるいはキラーT細胞、Bリンパ球の抗体産生を抑制するサプレッサーT細胞、リンフォカインなどの効果物質を分泌して遅延型アレルギーを起こすエフェクターT細胞（effector T cell）などがある。

【0003】

リンパ球系幹細胞のうち骨髄の中でそのまま分化成熟するのがB細胞である。B細胞は、適切な刺激があれば抗体を産生ようになる細胞で、抗体産生前駆細胞である。表面にはB細胞内で合成された免疫グロブリンがあり、抗原レセプターとして機能している。成熟したB細胞の表面にはIgMとIgDがともにあり、抗原刺激とT細胞からのシグナルで分化するとIgMの産生が増加し、C末端部の細胞膜結合部分が変わって分泌されるようになる。十分な刺激があると表面の免疫グロブリンもIgGやIgE、IgAに変化するとともに、それぞれのクラスの免疫グロブリンを分泌するようになる。B細胞表面の免疫グロブリンは、表面のIgということでもsIgとか、細胞膜のIgということでmIgと表現されることもある。一つのB細胞の表面にあるIgはすべて同じ抗原結合部位を有する。

【0004】

T細胞でもなくB細胞でもないリンパ球で、LGL (large granular lymphocyte)あるいはヌルセル (null cell) と呼ばれるものがある。この細胞には、腫瘍細胞やウイルス感染細胞の障害能力があるが、細胞障害性T細胞の場合と異なり、あらかじめ抗原刺激をしておく必要がない。そのためナチュラルキラー細胞（NK細胞：natural killer cell）ともいわれる。

【0005】

上記のT細胞の内、CD4陽性T細胞は、抗原提供細胞によって提示された抗原に反応すると、いろいろなサイトカインを分泌し、それらのサイトカインに対するレセプターなどが新たに発現し、細胞自身も大きくなり、分裂を始め、増殖する。このような細胞レベルの反応に先立って、それぞれのT細胞に特有の抗原レセプター（T cell antigen receptor：TCR）に抗原提供細胞上の抗原ペプチドとMH CクラスII分子の複合体が結合し、それによって細胞内ではいろいろな生化学的变化が生じて核内にシグナルが伝わり、特定のDNAの転写が始まり、それぞれの

タンパク質が合成される。その結果として、細胞レベルの反応が見られるようになるわけである。また、CD8陽性T細胞に関しては例えば、あるウイルスに感染した細胞を考えると、この感染した細胞はウイルスタンパク質を合成し、そのタンパク質が細胞質内のプロテアソームで分解され、一部のペプチドがTAPを経て小胞体内に入り、合成されたばかりのMHCクラスI分子と安定した複合体を形成して細胞表面にでる。これを特異的なCD8陽性T細胞が認識するが、この段階ではまだその細胞を破壊することはない。抗原に反応したこのT細胞はIL-2レセプター（IL-2R）を発現し、それにIL-2が作用すると細胞障害活性を持つCTLに分化し、次に同じ抗原ペプチド/MHCクラスI複合体に出会った時にその標的細胞を破壊して殺すことになる。CTLへ分化するのに必要なサイトカインはIL-2ばかりでなく、 $IFN\gamma$ やその他のサイトカインにも類似の作用があるといわれる。このように、CTLへの分化にはT細胞の分泌するリンフォカインが必要であるが、それらのリンフォカインはCD4陽性Th1細胞（IL-2や $IFN\gamma$ などを分泌するCD4陽性T細胞）が同じウイルスに由来する抗原のペプチドをクラスII分子とともに認識して産生している。CD4陽性T細胞の助けがなくても、CD8陽性T細胞が抗原に反応してIL-2などを産生している場合もある。CD8陽性T細胞がCTLに分化すると、細胞質内に顆粒が増加してくる。この顆粒のなかにはいろいろな高分子タンパク質が含まれており、パーフォリンはその代表である。パーフォリンは補体の第5-9成分で構成される膜侵襲複合体（membrane attack complex: MAC）によく似ており、標的細胞の細胞膜に穴をあける作用がある。その他、セリンプロテアーゼやLT、プロテオグリカン（proteoglycan）なども含まれている。また、CTLに分化して抗原刺激を受けると $IFN\gamma$ 、LT、TNFあるいはIL-2などのリンフォカインも分泌する。また、T細胞は汎血球凝集素（植物凝集素、PHA）やコンカナバリンA（Con A）に反応して芽球化現象を示す。

【0006】

また、まだ何も刺激を受けていない状態の成熟T細胞は、静止期T細胞（resting T cell）と呼ばれ、細胞の大きさが小さく、寿命も数日で短い。刺激を受けると、すでに述べたように細胞は大きくなり、いろいろな刺激に対してさらに反応しやすくなる。このようなT細胞を活性化T細胞（activated T cell）と呼ぶ。一

部の活性化T細胞は、記憶T細胞 (memory T cell) となり、同じ抗原刺激を受けると二次免疫反応をもたらすことになる。記憶T細胞は数年あるいは数十年も体内を循環し続けるといわれている。

【0007】

B細胞でまだ何も刺激を受けていない状態のものを、T細胞の場合と同じように静止期B細胞 (resting B cell) といい、多価の抗原やCD40Lで刺激され、増殖を起こしたようなB細胞を活性化B細胞 (activated B cell) という。静止期B細胞には、B7-1 (CD80) やB7-2 (CD86) のようなコスティミュレーター分子 (TCRを介したシグナルとともにT細胞を刺激する分子) がなく、静止期T細胞に抗原を提供してもTCRを刺激するだけで、CD40リガンド (CD40L) を発現させたり、リンフォカインを産生させたりすることができないといわれている。そのため、ほかの抗原提供細胞によって抗原刺激され、活性化されたヘルパーT細胞が静止期B細胞の抗原提示に反応するものと考えられている。すなわち、抗原が侵入してきた場合には、まずB7分子を発現している樹状細胞 (著しい樹状の突起を有する細胞) や微生物に反応して活性化されたマクロファージがその抗原を提示して、休止期ヘルパーT細胞を刺激し、CD40Lを発現させるなど活性化してから、同じ抗原を提示する静止期B細胞に結合してそのCD40を刺激すると考えられている。多価の抗原やCD40Lで刺激されて一度活性化されると、B細胞もB7分子を発現し、TCRとともに表面のCD28を刺激してそのヘルパーT細胞を活性化し、CD40Lを発現させたり、リンフォカインを産生させたりすることができる。また、刺激を受けて細胞が大きくなるなどの変化は見られるものの、抗体の分泌はほとんど見られない状態のB細胞を活性化B細胞 (activated B cell) という。さらに成熟B細胞になって抗原に出会うと、T細胞からの刺激も加わってIgMの産生が高まり、産生するIgMが膜型から分泌型に変わって分泌されるようになる。さらに、T細胞からの液性因子によってIgMからIgGなどのほかのアイソタイプの抗体を産生するようになる。これをアイソタイプスイッチあるいはクラススイッチという。抗体を分泌するようになったB細胞は抗体分泌細胞 (antibody-secreting cell) と呼ばれるようになり、一部は形態学的にも特徴のある細胞となり、形質細胞 (plasma cell) と呼ばれる (免疫学の知識、オーム社(1996))。

【0008】

ところで免疫系の様々な反応において、白血球はそのサブポピュレーション、即ち、Tリンパ球、Bリンパ球、NK、好中球などがそれぞれ異なった動態を示す場合が多い。また、上記のように同じリンパ球であっても、その細胞の状態、即ち、活性化しているか、静止期にあるかにより、それぞれ異なった動態を示す。これらの事実は、白血球のサブポピュレーション特異的な認識機構、さらには細胞の状態に特異的な認識機構、特に細胞接着分子（細胞接着タンパク質）の存在を示唆するものである。

【0009】

細胞接着分子、即ち、細胞接着タンパク質は、一般に、個体の発生・分化の際に、あるいは細胞の局所への遊走の際に、細胞同士を互いに接着させる機能を有する分子であり、生体の有機的かつ機能的な連絡にとって必須の分子であることが知られている。

【0010】

細胞接着分子は、その構造的特徴から大きく免疫グロブリンスーパーファミリー、インテグリンファミリー、セクレチンファミリー、カドヘリンファミリー、CD44ファミリーの5つに分類されている。免疫グロブリンスーパーファミリーに属する接着分子は、ジスルフィド結合で形成されるループ様ドメインを繰り返し持つことを特徴としており、「ICAM-1」(intercellular adhesion molecule-1)、「VCAM-1」(vascular cell adhesion molecule-1)などの分子が知られている。また、インテグリンファミリーに属する接着分子は、 α/β ヘテロダイマー構造を特徴とし、「VLA-1~6」(very late antigen-1~6)、「LFA-1」(lymphocyte function-associated antigen-1)、「Mac-1」、「p150/90」などが知られている。セクレチンファミリーに属する分子は、N末端から順に、レクチン様ドメイン、EGF様ドメイン、補体ドメインを有し、「E-セクレチン」,「P-セクレチン」などが知られている。さらに、カドヘリンファミリーとしては、「E-カドヘリン」、「N-カドヘリン」、「P-カドヘリン」が、CD44ファミリーには、「CD44」が知られている。

【0011】

これら接着分子の具体的な機能としては、白血球の血管内皮細胞への接着やリンパ球の抗原提示細胞への接着などが知られているが、近年における様々な研究から、これらの機能のみならず種々の疾患にも関係していることが徐々に明らかとなってきた。

【0012】

特に、疾患と接着分子の発現異常に関しては、多くの報告がなされている。例えば、慢性関節リウマチ (RA) については、RA滑膜細胞において、「Mac-1」と「p150/95」の両者の発現が増強していることが報告されている (Allen, C et al. *Arthritis Rheum.*, 32, 947 (1989))。また、RA滑膜では、様々な細胞が「ICAM-1」を強く、かつ異所性に発現していることが報告されている (Hale, L. et al. *Arthritis Rheum.*, 32, 22 (1989))。さらに、「ELAM-1」も好中球と血管内皮細胞の接着に関与しており、これら分子の過剰発現は、RA関節液中に見られる好中球の浸潤 (特に関節液中への) に関与していることが示唆されている (Laffon, A., et al. *Arthritis Rheum.*, 32, 386 (1989))。さらに、「CD44」もRA滑膜において、血管内皮細胞、A型滑膜細胞に強く発現していることが報告されている (Heynes, B. et al. *Arthritis Rheum.*, 34, 1434 (1991))。

【0013】

また、全身性エリテマトーデス (SLE) と接着分子の発現異常との関係についても例があり、例えば、SLE患者ではTリンパ球の培養血管内皮細胞に対する接着能が健康人と比較すると低下していることが報告されている。また、SLE患者の抹消リンパ球における接着分子の発現検討では、「ICAM-1」、「VLA-4」、「IFA-1」の増強傾向が見られている (Haskard, D.O., et al. *Rheumatol. Int.*, 9, 33 (1989))。

【0014】

自己免疫性甲状腺疾患については、甲状腺濾胞細胞をインターフェロン- γ 、インターロイキン-1、腫瘍壊死因子で刺激すると「ICAM-1」が発現すること、濾胞細胞と単核細胞とのクラスター形成が、抗「ICAM-1」抗体により抑制されることが報告されている (Weetman, A.P., et al. *Eur. J. Immunol.*, 20, 271 (1990))。

【0015】

肝炎では、肝細胞と炎症細胞間の接着が「ICAM-1」と「LFA-3」、「LFA-1」と「CD2」という2つの経路で行なわれることでその機会を増加させ、抗原の提示や炎症細胞の活性化が促進されると考えられている。特に、B型肝炎における検討では「LFA-3」がウイルス増殖の盛んな肝細胞に強く発現し、「ICAM-1」が肝炎の程度によく相関していることから、「LFA-3」がウイルスの排除に関与し、また「ICAM-1」がT細胞への抗原提示を促進させ炎症反応を調節していることが示唆されている。「ICAM-1」陰性でHBc抗原陽性の肝細胞の場合はリンパ球との細胞間相互作用が起こらずウイルス感染の慢性化という一種の免疫不応答の状態が生じるのではないかと考えられる。急性肝炎や慢性活動性肝炎、肝硬変患者の血清「ICAM-1」濃度が健常者や慢性持続性肝炎患者よりも高く、また活動性肝炎患者のうちでも組織学的に進行した症例で高値を認めることから慢性肝疾患における血清「ICAM-1」が肝細胞の障害の程度と相関するとの報告もなされている (Mod.Phys.15,(1),73-76(1995))。

【0016】

動脈硬化のモデル動物では、その病変発症のごく初期において血管内皮への単球やリンパ球の接着、侵入が認められ、これら血球細胞と内皮の相互作用が動脈硬化発症の第一段階と考えられている。また、実際の動脈硬化巣における接着分子の発現については、種々の報告がなされている。例えば、ヒト動脈硬化巣における「ICAM-1」の発現 (Poston RN, et al. Am J Patol, 140, 665(1992)) や高コレステロール血症ウサギの動脈硬化巣における「VCAM-1」の発現 (Cybulsky MI, Gimbrone MA Jr. Science, 251, 788(1991)) について報告例がある。さらに最近、ヒトの動脈硬化巣においても「VCAM-1」が発現していることが観察されており、その発現が特に内膜に遊走した平滑筋細胞と単球/マクロファージに強く認められたことが報告されている。また、ウサギおよびヒト動脈硬化巣において「MCP-1」の発現亢進が認められており、「MCP-1」が単球/マクロファージの遊走を介して動脈硬化巣の形成を促進しているという示唆もある (カレントセラピー, 12, (8), 1485-1488(1994))。

【0017】

さらに、癌転移と接着分子異常の関係についても報告がある。例えば、E-カド

ヘリンの低下した癌細胞は、強い侵襲性を示すが、これにE-カドヘリンのcDNAを導入すると侵襲性が抑制され、さらに、E-カドヘリン抗血清を添加すると侵襲性が回復することが見出されており、E-カドヘリンの発現低下と癌細胞の侵襲性の密接な関連が示唆されている (Frixen, U.H., et al. 113, 173 (1991))。実際の臨床例においても、肝癌、食道癌、胃癌、乳癌など種々の癌でE-カドヘリンの発現低下と転移との関係が指摘されている。また、「VCAM-1」のリガンドである「VLA-4」は転移性メラノーマ、胃癌、乳癌などで高発現することが報告されており、これらが転移に際して血管内皮細胞への着床に利用される可能性が示唆されている。また、種々の癌細胞株を用いた実験から胃癌、大腸癌、肺癌、肝癌、膵癌などの上皮性の癌はE-セレクトインを介して血管内皮細胞に接着するとの報告もなされている (Takada, A., et al. Cancer Res., 53, 354 (1993))。

【0018】

一方、これら接着分子を標的とした疾患治療の試みもなされている。例えば、抗ラット「ICAM-1」抗体がラット自己免疫性関節炎モデルでの炎症反応を強く抑えることが報告されている。また、RAの動物モデルの一つとされるアジュバンド滑膜炎では、抗「ICAM-1」抗体を投与することにより、関節炎の発症が抑制されることが報告されている (日本臨床免疫学会誌、14, (6), 571-577 (1991))。さらに、一部のインテグリンが認識し結合する細胞外マトリックス蛋白上のアミノ酸配列であるREG配列のペプチドを多量に胆癌マウスへ投与すると、接種腫瘍の転移形成が顕著に抑制され、またインビトロの系では、RGDペプチドや抗 $\beta 1$ サブユニット抗体が癌細胞の運動や浸潤を抑制することが報告されている (Yamada, K.H., et al. Cancer Res, 50, 4485, (1990))。

【0019】

しかし、上記のように多くの細胞接着分子がこれまでに単離されているが、白血球のサブポピュレーション特異的に発現する細胞接着分子はほとんど単離されておらず、このため上記のような細胞接着分子を標的とする疾患治療には、血管やリンパ管などに存在する正常な（非活性化、静止期）リンパ球の細胞間接着やマトリックスへの接着をも阻害してしまうという問題点があった。そこで、炎症の治療においては、炎症部位における過剰に存在する活性化されたリンパ球を特

異的に阻害する治療方法が望まれていた。

【0020】

【発明が解決しようとする課題】

本発明者らは、仮に、白血球のサブポピュレーション特異的に発現する細胞接着分子を同定することができれば、特定の白血球をターゲットとした医薬品の開発が可能になると考えた。さらに、これら分子の単離過程において、例えば、活性化されたリンパ球に特異的に発現する細胞接着分子を同定することができれば、正常な白血球への悪影響の少ない炎症治療が可能になると考えた。

【0021】

そこで、本発明は、白血球のサブポピュレーション特異的に発現する新規な細胞接着分子を提供することを課題とする。特に、本発明は、活性化されたリンパ球特異的に発現する細胞接着分子を提供することを課題とする。

【0022】

【課題を解決するための手段】

本発明者らは白血球の中でも、リンパ球が自己免疫疾患やアレルギー疾患などにおいて重要な働きをしていることから、特にリンパ球に特異的に発現する細胞接着分子の単離を行うことを考えた。また、リンパ球特異的に発現する細胞接着分子を単離する方法として、まず、リンパ球系細胞自体を免疫して抗体を取得し、得られた抗体を用いて細胞接着分子の単離を行うこととした。以下、具体的に説明する。

【0023】

本発明者らは、まず、ラットリンパ球系細胞株を免疫原としてマウスに投与し、モノクローナル抗体の単離を行った。次いで、本発明者らは、得られたモノクローナル抗体を、免疫原細胞であるラットリンパ球系細胞に作用させ、該抗体の免疫原細胞に与える影響について検討した。この結果、本発明者らは、得られた抗体の中の一つが免疫原細胞であるラットリンパ球系細胞を強く凝集させる特性を有することを見出した（以下、この抗体を「JTT.1抗体」と称する）。また、本発明者らは、得られた抗体の中の他の一つが「JTT.1抗体」によるラットリンパ球系細胞の凝集を強く阻害することを見出した（以下、この抗体を「JTT.2抗

体」と称する)。なお、「JTT.1抗体」によるラットリンパ球系細胞の凝集は、既知の細胞接着分子である「LFA-1」や「ICAM-1」に対する抗体により阻害されなかったことから、本発明者らはこの凝集が未知の接着経路を介していると考えた。

【0024】

本発明者らは、次に、この2つの抗体が認識する抗原（以下、「JTT.1抗原」、「JTT.2抗原」と称する）の特徴の解析を行った。

【0025】

まず、蛍光抗体法を用いて、種々の細胞における「JTT.1抗原」及び「JTT.2抗原」の発現パターンの解析を行った。この結果、本発明者らは「JTT.1抗原」及び「JTT.2抗原」が、静止期リンパ球にはほとんど発現せず、胸腺細胞および活性化リンパ球細胞、特に活性化リンパ球細胞に強く発現していることを見出した。次いで、「JTT.1抗原」および「JTT.2抗原」の分子量の測定を行った。この測定の結果、両抗原が全く同一の抗原であり、この抗原が糖鎖修飾が異なるホモダイマー分子であることを見出した。本発明者らは、さらに、「JTT.1抗原」に対するラット胸腺細胞の接着の解析を行った。この結果、胸腺細胞は、「JTT.1抗体」存在下でのみ有意に「JTT.1抗原」に接着し、その接着は「JTT.2抗体」により有意に阻害されることを見出した。即ち、本発明者らは、「JTT.1抗原」が実際に接着分子として機能することを証明した。

【0026】

本発明者らは、次に、ラット及びヒトの「JTT.1抗原」遺伝子のクローニング及びその構造の解析を行った。具体的には、「JTT.1抗体」を用いた発現クローニング法により、調製した活性化ラット脾細胞のcDNAライブラリーから、「JTT.1抗原」cDNAを単離し、ジデオキシ法によりその塩基配列を決定した。さらに得られたラット「JTT.1抗原」cDNAをプローブとして、ヒト「JTT.1抗原」cDNAをブランクハイブリダイゼーションによりクローニングし、その塩基配列を決定し、その構造などの解析を行った。この結果、本発明者らは、単離したcDNAがヒト「JTT.1抗原」の全長をコードしていることを見出した。さらに、アミノ酸配列のハイドロパシープロット解析から「JTT.1抗原」がシグナル配列、膜貫通領域

、細胞外領域に糖鎖修飾部位を持つ膜貫通蛋白であることを推定した。さらに、ホモロジー検索の結果、「JTT.1抗原」が様々な接着分子を含め既知の分子とは有意な相同性のない全く新規な接着分子であることを見出した。

【0027】

即ち、本発明は、新規な細胞接着分子、該細胞接着分子をコードする遺伝子、該遺伝子を含むベクター、該ベクターが導入された形質転換体、該細胞接着分子に対する抗体、該抗体を産生するハイブリドーマに関する。より具体的には、本発明は、

(1) 細胞-細胞間若しくは細胞-マトリックス間の接着を仲介する細胞接着タンパク質であって、活性化リンパ球に実質的に発現し、静止期リンパ球には実質的に発現しない細胞接着タンパク質、例えば、

(2) 配列番号：2に記載のアミノ酸配列、または配列番号：2に記載のアミノ酸配列中のアミノ酸において1もしくは数個のアミノ酸が置換、欠失もしくは付加されたアミノ酸配列を有する、(1)に記載の細胞接着タンパク質、

(3) 配列番号：1に記載のDNA配列からなるDNAとハイブリダイズするDNAがコードするタンパク質である、(1)に記載の細胞接着タンパク質、

(4) 配列番号：2に記載のアミノ酸配列と60%以上の相同性を有する、(3)に記載の細胞接着タンパク質、好ましくは、

(5) ヒト由来である、(1)乃至(4)に記載の細胞接着タンパク質、に関する。

【0028】

また、本発明は、

(6) (1)乃至(5)に記載のタンパク質をコードする遺伝子、

(7) 遺伝子がcDNAである、(6)に記載の遺伝子、に関する。

【0029】

また、本発明は、

(8) (6)または(7)に記載の遺伝子を含有するベクター、に関する。

【0030】

また、本発明は、

(9) (8)に記載のベクターが導入された形質転換体、例えば、

(10) 国際寄託番号 FERM BP-5725である形質転換体、に関する。

【0031】

また、本発明は、

(11) (1)乃至(5)に記載のタンパク質に反応する抗体またはその一部、好ましくは、

(12) 抗体がモノクローナル抗体である、(11)に記載の抗体又はその一部、例えば、

(13) モノクローナル抗体が国際寄託番号 FERM BP-5707であるハイブリドーマが産生する抗体である、(12)に記載の抗体もしくはその一部、

(14) モノクローナル抗体が国際寄託番号 FERM BP-5708であるハイブリドーマが産生する抗体である、(12)に記載の抗体もしくはその一部、に関する。

【0032】

また、本発明は、

(15) (12)に記載のモノクローナル抗体を産生するハイブリドーマ、例えば、

(16) 国際寄託番号 FERM BP-5707である、(15)に記載のハイブリドーマ、

(17) 国際寄託番号 FERM BP-5708である、(15)に記載のハイブリドーマ、に関する。

【0033】

さらに、本発明は、

(18) (11)乃至(14)に記載の抗体を含有してなる医薬組成物、好ましくは、

(19) 抗炎症剤である、(18)に記載の医薬組成物、に関する。

【0034】

なお、本発明において「活性化リンパ球」とは、何らかの刺激により活性化されたリンパ球を指す。前述のとおりリンパ球は、T細胞、B細胞、およびナチュラル

ルキラー細胞に分類され、さらにT細胞についてはCD4陽性細胞とCD8陽性細胞に分類することができる。従って、本発明の「活性化リンパ球」には、大きく活性化T細胞、活性化B細胞、および活性化ナチュラルキラー細胞が含まれ、さらに活性化T細胞には活性化CD4陽性細胞と活性化CD8陽性細胞が含まれる。

【0035】

CD4陽性T細胞は、抗原提供細胞によって提示された抗原に反応すると、いろいろなサイトカインを分泌し、それらのサイトカインに対するレセプターなどが新たに発現し、細胞自身も大きくなり、分裂を始め、増殖して活性化される。活性化CD4陽性T細胞とは、このような状態のCD4陽性T細胞を指す。

【0036】

CD8陽性T細胞は、抗原に反応するとIL-2Rを発現し、それにIL-2が作用すると細胞障害性をもつCTLに分化し、次に同じ抗原ペプチド/MHCクラスI複合体に出会った時にその標的細胞を破壊して殺すようになる。CD8陽性T細胞がCTLに分化すると、細胞質内に顆粒が増加してくる。この顆粒の中にはいろいろな高分子タンパク質が含まれており、パーフォリンはその代表である。パーフォリンは補体の第5-9成分で構成されるMACによく似ており、標的細胞の細胞膜に穴をあける作用がある。その他、セリンプロテアーゼやLT、プロテオグリカン (proteoglycan) なども含まれている。また、CTLに分化して抗原刺激を受けるとIFN γ 、LT、TNFあるいはIL-2などのリンフォカインも分泌する。活性化CD8陽性T細胞とは、このような状態のCD8陽性T細胞を指す。

【0037】

T細胞は汎血球凝集素 (植物凝集素、PHA) やコンカナバリンA (Con A) に反応して芽球化現象を示すが、このような状態のT細胞も活性化T細胞に含まれる。

【0038】

B細胞では、B7分子を発現し、TCRとともに表面のCD28を刺激してそのヘルパーT細胞を活性化し、CD40Lを発現させたり、リンフォカインを産生したりし、刺激を受けて細胞が大きくなったり、増殖を起こすなどの変化が見られる。活性化B細胞とは、このような状態のB細胞を指し、本発明においては、抗体を分泌するようになったB細胞 (抗体分泌細胞 (antibody-secreting cell) 及び形質細胞 (pla

sma cell)) も活性化B細胞に含まれる。

【0039】

活性化ナチュラルキラー細胞とは、前述のとおり腫瘍細胞やウイルス感染細胞の障害作用を示すナチュラルキラー細胞を指す。なお、本発明においては、コンカナバリンA (Con A) で刺激された胸腺細胞も活性化リンパ球に含まれる。

【0040】

本発明において「静止期リンパ球」とは、前述のとおりまだ何も刺激を受けていない非活性化状態のリンパ球を指す。

【0041】

本発明における「遺伝子」には、ゲノミックDNAおよびcDNAが含まれる。

【0042】

本発明において、「ヒト由来のタンパク質」とは、ヒト細胞から単離された天然のタンパク質、組み換えタンパク質の他、これらタンパク質のアミノ酸配列中のアミノ酸の1もしくは数個のアミノ酸配列が置換、欠失もしくは付加したアミノ酸配列を有する人工のタンパク質も含まれる。

【0043】

本発明において「活性化リンパ球には実質的に発現する」とは、前期のごときインターロイキン等のサイトカインによって活性化された非静止期のリンパ球において発現しており、静止期の発現状態と比較した場合に該タンパク質の機能面からみて明らかに区別ができ、該タンパク質の機能を実質的に発現しうる程度に発現している状態を指す。

【0044】

本発明において「静止期リンパ球には実質的に発現しない」とは、前記のごとき静止期リンパ球においては発現していないか、該タンパク質の機能を実質上発揮し得ない程度の発現を指す。

【0045】

本発明において「細胞-細胞間若しくは細胞-マトリックス間の接着に関与する」とは、特定の条件下（例えば、特定の細胞上や特定の抗体の存在下など）において、細胞-細胞間若しくは細胞-マトリックス間の接着機能を有することを

指す。

【0046】

【発明の実施の形態】

本発明は、活性化リンパ球に実質的に発現し、静止期リンパ球には実質的に発現しないタンパク質であり、かつ細胞-細胞間若しくは細胞-マトリックス間の接着に関与するタンパク質に関する。

【0047】

本発明には、配列番号：2に記載される細胞接着タンパク質も含まれる。該タンパク質は、非活性化リンパ球細胞にはほとんど発現せず、活性化リンパ球細胞及び胸腺細胞、特に活性化リンパ球細胞に強く発現するという性質を有し、「JT T.1抗体」の存在下において、活性化リンパ球同士を接着させる機能を有する。また、「JT T.1抗原」は糖鎖の数が異なる膜貫通型ホモダイマー分子であると推定され、さらに細胞内領域に3箇所のリン酸化部位が存在すると推定される。このため該タンパク質は、例えば、セレクチンのような単なる血流中でのリンパ球の血管内皮細胞への接着ではなく、リンパ球が炎症組織に浸潤し抗原刺激により活性化リンパ球になることにより初めて発現し、炎症部位の種々の細胞と接着し、シグナル伝達を介して炎症免疫反応を誘導するなどの機能を有すると推定される。

【0048】

なお、当業者であれば、本発明のタンパク質の置換・欠失・挿入は常法（実験医学別冊 遺伝子工学ハンドブック(1992)）により行うことができる。従って、配列番号：2に記載のタンパク質のアミノ酸配列中のアミノ酸において1もしくは数個のアミノ酸が置換、欠失もしくは付加されたアミノ酸配列を有し、細胞-細胞間若しくは細胞-マトリックス間の接着を仲介する細胞接着タンパク質であって、活性化リンパ球に実質的に発現し、静止期リンパ球には実質的に発現しない細胞接着タンパク質も本発明の範囲に含まれる。

【0049】

常法としては、例えば、合成オリゴヌクレオチド指定突然変異導入法（gapped duplex）法、亜硝酸あるいは亜硫酸処理によってランダムに点突然変異を導入

する方法、Bcl31酵素等により欠失変異体を作製する方法、カセット変異法、リンカースキャニング法、ミスインコーポレーション法、ミスマッチプライマー法、DNAセグメント合成法などを挙げることができる。さらに、合成オリゴヌクレオチド指定突然変異導入 (gapped duplex) 法について説明すると、アンバー変異をもつM13ファージベクターに変異誘起を希望する領域をクローニングし、一本鎖ファージDNAを調製する。アンバー変異をもたないM13ベクターのRFIDNAを制限酵素処理により線状とし、上記の一本鎖ファージDNAと混合して変性後、アニールさせ、「gapped duplex DNA」を形成させる。これに変異を導入した合成オリゴヌクレオチドをハイブリダイズさせ、DNAポリメラーゼとDNAリガーゼの反応により閉環状二本鎖DNAとする。このDNAをミスマッチ修飾能が欠損している大腸菌mutS株にトランスフェクションし、増殖したファージをサプレッサー機能のない大腸菌に感染させ、アンバー変異を持たないファージだけを選択する。以上の方法により突然変異の誘起が可能である。また、亜硝酸による点突然変異を導入する方法は、DNAを亜硝酸処理すると塩基が脱アミノ化されて、アデニンはヒポキサンチンに、シトシンはウラシルに、グアニンはキサンチンになる。脱アミノ化されたDNAを細胞に導入すると、DNA複製時にヒポキサンチンはシトシンと、ウラシルはアデニンとキサンチンはチミンと塩基対を形成するため、「A:T」が「G:C」へ、「G:C」が「A:T」へと置換する。実際には亜硝酸処理した一本鎖DNA断片を「gapped duplex DNA」にハイブリダイズさせ、以下、合成オリゴヌクレオチド指定突然変異導入 (gapped duplex) 法と同様に操作して変異株を分離すればよい。

【0050】

さらに、当業者にとっては、本発明の出願時には周知技術であるハイブリダイゼーション技術（日本生化学実験講座1. 遺伝子研究法II (1986)）を用いて、配列番号：1に記載のDNA配列（またはその一部）を基に、これと相同性の高いDNAを単離して、該DNAから本発明のタンパク質の機能的同等物を得ることも常套手段である。従って、配列番号：1に記載のDNA配列からなるDNAとハイブリダイズするDNAがコードするタンパク質であって、細胞-細胞間若しくは細胞-マトリックス間の接着を仲介する細胞接着タンパク質であって、活性化リンパ球に実質

的に発現し、静止期リンパ球には実質的に発現しない細胞接着タンパク質も本発明の範囲に含まれる。なお、ハイブリダイズ技術により得られたタンパク質は、本発明のタンパク質とアミノ酸配列において60%以上の相同性を有することが好ましい。

【0051】

本発明のタンパク質の調製方法としては、種々の方法が挙げられるが、特に制限はない。例えば、下記の「国際寄託番号 FERM BP-5707」のハイブリドーマが産生するモノクローナル抗体（JTT.1抗体）または「国際寄託番号 FERM BP-5708」のハイブリドーマが産生するモノクローナル抗体（JTT.2抗体）を結合したアフィニティーカラムを用いて調製することが可能である。

【0052】

また、本発明のタンパク質には、遺伝子組み換え技術により調製した組み換えタンパク質も含まれ、該組み換えタンパク質は、例えば、本発明のタンパク質をコードするDNA（例えば、配列番号：1に記載のDNA）を適当な発現ベクターに挿入し、これを宿主細胞に導入して形質転換体を作製し、該形質転換体から精製することにより調製することが可能である。この他にも、化学的合成法、細胞培養方法など当該技術分野において知られる公知の方法あるいはその修飾方法を適宜用いて調製することができる。

【0053】

また、本発明は、上記の本発明のタンパク質をコードする遺伝子に関する。

【0054】

本発明の遺伝子は、本発明のタンパク質をコードしうるものであればいかなる塩基配列を有するものでもよい。また、本発明の遺伝子は、いかなる方法で得られるものであってもよい。例えば、mRNAから調製される相補DNA（cDNA）、ゲノムDNAから調製されるDNA、化学合成によって得られるDNA、RNAまたはDNAを鋳型としてPCR法で増幅させて得られるDNA、およびこれらの方法を適当に組み合わせで構築されるDNAも、本発明の遺伝子に含まれる。

【0055】

本発明の遺伝子は、常法に従って本発明のタンパク質のmRNAからcDNAをクロー

ン化する方法、ゲノムDNAを単離してスプライシング処理する方法、化学合成する方法等により取得することができる。

【0056】

例えば、配列番号：2に示される「JTT.1抗原」のmRNAからcDNAをクローン化する方法としては、以下の方法が例示される。

【0057】

まず、JTT.1抗原タンパク質を発現・産生するFTL435細胞などの細胞を培養し、細胞を回収した後、その細胞から「JTT.1抗原」をコードするmRNAを調製する。mRNAの調製は、例えばグアニジンチオシアネート法 (Chirgwin, J.M. et al., *Biochem.*, 18, 5294 (1979))、熱フェノール法、またはAGPC法等の公知の方法を用いて調製した全RNAをオリゴ (dT) セルロースやポリU-セファロース等によるアフィニティークロマトグラフィーにかけることによって行うことができる。次いで、得られたmRNAを鋳型として、例えば逆転写酵素を用いる等の公知の方法 (例えば、Okayama, H. らの方法 (Okayama, H. et al., *Mol. Cell. Biol.*, 2, 161 (1982) 及び同誌 3, 280 (1983)) や Gubler, U. と Hoffman, B.J. の方法 (Gubler, H. and Hoffman, B.J., *Gene*, 25, 263 (1983)) が例示される) でcDNA鎖を合成し、cDNAの二本鎖cDNAへの変換を行う。このcDNAをプラスミドベクターもしくはファージベクターに組み込み、大腸菌を形質転換して、あるいはインビトロパッケージング後、大腸菌に形質移入 (トランスフェクト) することによりcDNAライブラリーを作製する。

【0058】

ここで用いられるプラスミドベクターとしては、宿主内で複製保持されるものであれば特に制限されず、また用いられるファージベクターとしても宿主内で増殖できるものであればよい。常法的に用いられるクローニングベクターとしてpUC119、 λ gt10、 λ gt11等が例示される。ただし、後述の免疫学的スクリーニングに供する場合は、宿主細胞内で「JTT.1抗原」遺伝子を発現させうるプロモーターを有したベクターであることが好ましい。

【0059】

プラスミドにcDNAを組み込む方法としては、例えば、「Maniatis, T. ら, *モレキュラークロークローニング*, ア・ラボラトリー・マニュアル (Molecular Clonin

g, A Laboratory Manual, second edition), Cold Spring Harbor Laboratory, 1.53(1989)」に記載の方法などが挙げられる。また、ファージベクターにcDNAを組み込む方法としては、Hyunh, T.V.らの方法 (Hyunh, T.V., DNA Cloning, a practical approach, 1, 49(1985)) などが挙げられる。簡便には、市販のライゲーションキット (例えば、宝酒造製等) を用いることもできる。このようにして得られる組換えプラスミドやファージベクターは、原核細胞 (例えば、E.coli HB101, DH5またはMC1061/P3等) 等の適当な宿主細胞に導入する。

【0060】

プラスミドを宿主細胞に導入する方法としては、「Maniatis, T.ら, モレキュラークローニング, ア・ラボラトリー・マニュアル (Molecular Cloning, A Laboratory Manual, second edition), Cold Spring Harbor Laboratory, 1.74(1989)」に記載の塩化カルシウム法または塩化カルシウム/塩化ルビジウム法、エレクトロポレーション法等が挙げられる。また、ファージベクターを宿主細胞に導入する方法としてはファージDNAをインビトロパッケージングした後、増殖させた宿主細胞に導入する方法等が例示される。インビトロパッケージングは、市販のインビトロパッケージングキット (例えば、ストラタジーン社製、アマシャム社製等) を用いることによって簡便に行うことができる。

【0061】

上記の方法によって作製されたcDNAライブラリーから、本発明の「JTT.1抗原」をコードするcDNAを単離する方法は、一般的なcDNAスクリーニング法を組み合わせることによって簡便に行うことができる。

【0062】

例えば、別個に「JTT.1抗原」のアミノ酸配列に対応すると考えられるオリゴヌクレオチドを化学合成したのち、これを³²Pでラベルしてプローブとなし、公知のコロニーハイブリダイゼーション法 [Crunstein, M. and Hogness, D. S. : Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 72, 3961 (1975)] またはブランクハイブリダイゼーション法 [Molecular Cloning, A Laboratory Manual, second edition, Cold Spring Harbor Laboratory, 2, 108 (1989)] により、目的のcDNAを含有するクローンをスクリーニングする方法、PCRプライマーを作製し「JTT.1抗原」の特

定領域をPCR法により増幅し、該領域をコードするDNA断片を有するクローンを選択する方法等が挙げられる。また、cDNAを発現しうるベクター（例えば、 λ gt11 ファージベクター）を用いて作製したcDNAライブラリーを用いる場合には、「JTT.1抗原抗体」を用いる抗原抗体反応を利用して、目的のクローンを選択することができる。大量にクローンを処理する場合には、PCR法を利用したスクリーニング法を用いることが好ましい。

【0063】

この様にして得られたDNAの塩基配列はマキシム・ギルバート法 [Maxam, A. M. and Gilbert, W., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 74, 560 (1977)] あるいはファージM13を用いたジデオキシヌクレオチド合成鎖停止の方法 [Sanger, f. ら, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 74, 5463-5467 (1977)] によって決定することができる。「JTT.1抗原」遺伝子は、その全部または一部を上記のようにして得られるクローンから制限酵素等により切り出すことにより取得できる。

【0064】

また、FTL435等の哺乳動物に由来する細胞のゲノムDNAから「JTT.1抗原」をコードするDNAを単離することによる調製方法としては、例えば以下の方法が例示される。FTL435細胞を好ましくはSDSまたはプロテナーゼK等を用いて溶解し、フェノールによる抽出を反復してDNAの脱蛋白質を行う。RNAを好ましくはリボヌクレアーゼにより消化する。得られるDNAを適当な制限酵素により部分消化し、得られるDNA断片を適当なファージまたはコスミドで増幅しライブラリーを作製する。そして目的の配列を有するクローンを、例えば放射性標識されたDNAプローブを用いる方法等により検出し、該クローンから「JTT.1抗原」遺伝子の全部または一部を制限酵素等により切り出し取得する。

【0065】

さらに、化学的合成による本発明のDNAの製造は、配列番号:1に記載の塩基配列を基にして、常法に従って行うことができる。

【0066】

また、本発明は、本発明の遺伝子を含有するベクターに関する。

本発明のベクターとしては、原核細胞及び／または真核細胞の各種の宿主内で

複製保持または自己増殖できるものであれば特に制限されず、プラスミドベクター、およびファージベクターが包含される。

【0067】

本発明のベクターは、簡便には当業界において入手可能な組換え用ベクター（プラスミドDNAおよびバクテリアファージDNA）に本発明の遺伝子を常法により連結することによって調製することができる。用いられるベクターとしては、具体的には、大腸菌由来のプラスミドとして、例えば、pBR322、pBR325、pUC12、pUC13などが、酵母由来プラスミドとして、例えば、pSH19、pSH15などが、枯草菌由来プラスミドとして、例えば、pUB110、pTP5、pC194などが例示されるがこれらに制限されない。また、ファージとしてはλファージなどのバクテリオファージが、さらにレトロウイルス、ワクシニヤウイルス、核多角体ウイルスなどの動物や昆虫のウイルス[pVL1393（インビトロゲン社製）]などが例示されるがこれらに制限されない。

【0068】

本発明のタンパク質を生産する目的においては、特に、発現ベクターが有用である。発現ベクターとしては、原核細胞および／または真核細胞の各種の宿主細胞中で本発明の遺伝子を発現し、本発明のタンパク質を生産する機能を有するものであれば特に制限はないが、例えば、大腸菌（pGEX-5X-1）、またはSV-40由来の発現ベクターなどが好ましい。

【0069】

本発明の形質転換体は、本発明の発現ベクターを宿主細胞に導入することにより調製することができる。用いられる宿主細胞としては、本発明の発現ベクターに適合し、形質転換されうるものであれば特に制限はなく、本発明の技術分野において通常使用される天然細胞、または人工的に樹立された組換え細胞など種々の細胞を用いることが可能である。例えば、細菌（エシェリキア属菌、バチルス属菌）、酵母（サッカロマイセス属、ピキア属など）、動物細胞、昆虫細胞などが挙げられる。

【0070】

特に、大腸菌または動物細胞が好ましく、具体的には、大腸菌（DH5、HB101等

）、マウス由来細胞（COP、L、C127、Sp2/0、NS-1またはNIH3T3等）、ラット由来細胞、ハムスター由来細胞（BHKおよびCHO等）、サル由来細胞（COS1、COS3、COS7、CV1およびVelo等）およびヒト由来細胞（Hela、2倍体線維芽細胞に由来する細胞、ミエローマ細胞およびNamalwa等）などが例示される。

【0071】

宿主細胞として細菌、特に大腸菌を用いる場合、一般に発現ベクターは少なくとも、プロモーター-オペレーター領域、開始コドン、本発明の遺伝子、終止コドン、ターミネーター領域、および複製可能単位から構成される。

【0072】

宿主細胞として酵母、動物細胞または昆虫細胞を用いる場合には、一般に発現ベクターは少なくとも、プロモーター、開始コドン、本発明の遺伝子、終止コドンを含んでいることが好ましい。またシグナルペプチドをコードするDNA、エンハンサー配列、本発明遺伝子の5'側および3'側の非翻訳領域、スプライシング接合部、ポリアデニレーション部位、選択マーカー領域または複製可能単位などを適宜含んでもよい。また、目的に応じて通常用いられる遺伝子増幅遺伝子（マーカー）を含んでもよい。

【0073】

細菌中で本発明のタンパクを発現させるためのプロモーター-オペレーター領域は、プロモーター、オペレーター、および「Shine-Dalgarno (SD)」配列（例えば、AAGGなど）を含むものである。例えば、宿主細胞がエシェリキア属菌の場合には、Trpプロモーター、lacプロモーター、recAプロモーター、λ PLプロモーター、lppプロモーター、tacプロモーターなどを含むものが好ましい。酵母中で本発明のタンパク質を発現させるためのプロモーターとしては、PH05プロモーター、PGKプロモーター、GAPプロモーター、ADHプロモーターが挙げられ、宿主細胞がバチルス属菌の場合には、SL01プロモーター、SP02プロモーター、penPプロモーターなどが挙げられる。また、宿主細胞が哺乳動物細胞等の真核細胞である場合、SV40由来のプロモーター、レトロウイルスのプロモーター、ヒートショックプロモーターなどが挙げられる。好ましくは、SV-40、SR-α、レトロウイルスである。しかし、特にこれらに限定されるものではない。なお、本発明のタンパ

ク質の発現においては、エンハンサーの利用も効果的である。

【0074】

本発明のベクターにおいて、好適な開始コドンとしては、メチオニンコドン（ATG）が例示される。また、終止コドンとしては、常用の終止コドン（例えば、TAG, TGAなど）が例示される。

【0075】

ターミネーター領域としては、通常用いられる天然または合成のターミネーターを用いることができる。

【0076】

複製可能単位とは、宿主細胞中でその全DNA配列を複製することができる能力をもつDNAをいい、天然のプラスミド、人工的に修飾されたプラスミド（天然のプラスミドから調製されたDNAフラグメント）および合成プラスミド等が含まれる。好適なプラスミドとしては、E. coliではプラスミドpBR322、もしくはその人工的修飾物（pBR322を適当な制限酵素で処理して得られるDNAフラグメント）が、酵母では酵母2 μ プラスミド、もしくは酵母染色体DNAが、また哺乳動物細胞ではプラスミドpRSVneo ATCC 37198、プラスミドpSV2dhfr ATCC 37145、プラスミドpdBPV-MMTneo ATCC 37224、プラスミドpSV2neo ATCC 37149、プラスミドpME18S等があげられる。

【0077】

エンハンサー配列、ポリアデニレーション部位およびスプライシング接合部位については、例えば、それぞれSV40に由来するもの等、当業者において通常使用されるものを用いることができる。

【0078】

選択マーカーとしては、通常使用されるものを常法により用いることができる。例えばテトラサイクリン、アンピシリン、またはカナマイシン等の抗生物質耐性遺伝子などが例示される。

【0079】

遺伝子増幅遺伝子としては、ジヒドロ葉酸レダクターゼ（DHFR）遺伝子、チミジンキナーゼ遺伝子、ネオマイシン耐性遺伝子、グルタミン酸合成酵素遺伝子、

アデノシンデアミナーゼ遺伝子、オルニチンデカルボキシラーゼ遺伝子、ヒグロマイシン-B-ホスホトランスフェラーゼ遺伝子、アスパルラートトランスカルバミラーゼ遺伝子等を例示することができる。

【0080】

本発明の発現ベクターは、少なくとも、上述のプロモーター、開始コドン、本発明の遺伝子、終止コドン、およびターミネーター領域を連続的かつ環状に適当な複製可能単位に連結することによって調製することができる。またこの際、所望により制限酵素での消化やI4DNAリガーゼを用いるライゲーション等の常法により適当なDNAフラグメント（例えば、リンカー、他のレストリクションサイトなど）を用いることができる。

【0081】

本発明の発現ベクターの宿主細胞への導入[形質転換（形質移入）]は従来公知の方法を用いて行うことができる。

【0082】

例えば、細菌（*E. coli*, *Bacillus subtilis*等）の場合は、例えばCohenらの方法[*Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 69, 2110 (1972)]、プロトプラスト法[*Mol. Gen. Genet.*, 168, 111 (1979)]やコンピテント法[*J. Mol. Biol.*, 56, 209 (1971)]によって、*Saccharomyces cerevisiae*の場合は、例えばHinnenらの方法[*Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 75, 1927 (1978)]やリチウム法[*J. Bacteriol.*, 153, 163 (1983)]によって、動物細胞の場合は、例えばGrahamの方法[*Viriology*, 52, 456 (1973)]、昆虫細胞の場合は、例えばSummersらの方法[*Mol. Cell. Biol.*, 3, 2156-2165 (1983)]によってそれぞれ形質転換することができる。

【0083】

本発明のタンパク質は、これにより調製された本発明の発現ベクターを含む形質転換細胞（以下、形質移入体を包含する意味で使用する。）を栄養培地で培養することによって製造することができる。

【0084】

栄養培地は、宿主細胞（形質転換体）の生育に必要な炭素源、無機窒素源もし

くは有機窒素源を含んでいることが好ましい。炭素源としては、例えばグルコース、デキストラン、可溶性デンプン、ショ糖などが、無機窒素源もしくは有機窒素源としては、例えばアンモニウム塩類、硝酸塩類、アミノ酸、コーンスチープ・リカー、ペプトン、カゼイン、肉エキス、大豆粕、バレイショ抽出液などが例示される。また所望により他の栄養素[例えば、無機塩(例えば塩化カルシウム、リン酸二水素ナトリウム、塩化マグネシウム)、ビタミン類、抗生物質(例えばテトラサイクリン、ネオマイシン、アンピシリン、カナマイシン等)など]を含んでいてもよい。

【0085】

培養は、当業界において通常用いられている方法により行われる。培養条件、例えば温度、培地のpHおよび培養時間は、本発明のタンパク質が大量に生産されるように適宜選択される。

【0086】

なお、下記に宿主細胞に応じて用いられる具体的な培地および培養条件を例示するが、これらに限定されるものではない。

【0087】

宿主細胞が細菌、放線菌、酵母、糸状菌である場合、例えば上記栄養源を含有する液体培地が好ましい。培地のpHは5~8であることが好ましい。

【0088】

宿主細胞がE. coliの場合、好ましい培地としてLB培地、M9培地[Miller, J. E xp. Mol. Genet. , p. 431, Cold Spring Harbor Laboratory, New York (1972)]等が例示される。この場合、培養は、必要により通気、攪拌をしながら、通常14~43℃で、約3~24時間行うことができる。

【0089】

宿主細胞がBacillus属菌の場合、必要により通気、攪拌をしながら、通常30~40℃で、約16~96時間行うことができる。

【0090】

宿主が酵母である場合、培地として、例えばBurkholder最小培地[Bostian, K . L. et al, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 77, 4505 (1980)]が挙げられ、pH

は5～8であることが好ましい。培養は通常約20～35℃で約14～144時間行われ、必要により通気や攪拌を行うこともできる。

【0091】

宿主細胞が動物細胞の場合、培地として例えば約5～20%の胎児牛血清を含むMEM培地[Science, 122, 501 (1952)], DMEM培地[Virology, 8, 396 (1959)], RPMI1640培地[J. Am. Med. Assoc., 199, 519 (1967)], 199培地[Proc. Soc. Exp. Biol. Med., 73, 1 (1950)]等を用いることができる。培地のpHは約6～8であるのが好ましく、培養は通常約30～40℃で約15～72時間行われ、必要により通気や攪拌を行うこともできる。

【0092】

宿主細胞が昆虫細胞の場合、例えば胎児牛血清を含むGrace's培地[Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 82, 8404 (1985)]等が挙げられ、そのpHは約5～8であるのが好ましい。培養は通常約20～40℃で15～100時間行われ、必要により通気や攪拌を行うこともできる。

【0093】

本発明のタンパク質は、上記培養により得られる培養物より以下のようにして取得できる。

【0094】

すなわち、本発明のタンパク質が、培養物のうち培養液中に存在する場合には、得られた培養物を濾過または遠心分離等の方法で培養濾液(上清)を得て、この培養濾液から天然または合成タンパク質を精製並びに単離するために一般に用いられる常法に従って、本発明のタンパクを精製、単離する。

【0095】

単離、精製方法としては、例えば塩析、溶媒沈殿法等の溶解度を利用する方法、透析、限外濾過、ゲル濾過、ドデシル硫酸ナトリウム-ポリアクリルアミドゲル電気泳動など分子量の差を利用する方法、イオン交換クロマトグラフィーやヒドロキシルアパタイトクロマトグラフィーなどの荷電を利用する方法、アフィニティークロマトグラフィーなどの特異的親和性を利用する方法、逆相高速液体クロマトグラフィーなどの疎水性の差を利用する方法、等電点電気泳動などの等電

点の差を利用する方法などが挙げられる。

【0096】

一方、本発明のタンパク質が培養された形質転換体のペリプラズムまたは細胞質内に存在する場合は、培養物を濾過または遠心分離などの常法に付して菌体あるいは細胞を収穫し、適当な緩衝液に懸濁し、例えば超音波やリゾチーム及び凍結融解などの方法で細胞等の細胞壁および／または細胞膜を破壊した後、遠心分離や濾過などの方法で本発明のタンパク質を含有する膜画分を得る。次いで、膜画分をトライトン-X100等の界面活性剤を用いて可溶化して粗溶液を得る。そして、当該粗溶液を上述した常法を用いることにより、単離、精製することができる。

【0097】

なお、当業者であれば本発明のタンパク質の部分配列からなるタンパク質またはペプチドを単離し、これを免疫することにより下記の本発明のモノクローナル抗体を単離することは常套手段である。従って、本発明のタンパク質の一部からなり免疫原性を有するタンパク質またはペプチドも本発明の範囲に含まれる。

【0098】

また、本発明は、本発明のタンパク質に反応する抗体に関する。

【0099】

本発明の抗体は、本発明のタンパク質が発現している活性化リンパ球に実質的に結合し、本発明のタンパク質が実質的に発現していない静止期リンパ球には実質的に結合しないという特性を有する。本発明の抗体は、上記性質を有するポリクローナル抗体およびモノクローナル抗体を共に包含する。また、本発明のモノクローナル抗体には、IgG、IgM、IgA、IgDおよびIgEなるいずれのイムノグロブリンクラスに属するモノクローナル抗体をも包含し、好適には、IgGまたはIgMイムノグロブリンクラスモノクローナル抗体である。

【0100】

なお、活性化リンパ球細胞は、例えば、脾細胞をコカナバリンAで刺激するなどの方法で調製することが可能であり、また、モノクローナル抗体のリンパ球系細胞への結合活性は、例えば、抗体により染色したリンパ球をフローサイトメー

ターで解析するなどの方法により検出することができる。

【0101】

本発明の抗体は常法（例えば、文献「続生化学実験講座5、免疫生化学研究法、日本生化学会編：東京化学同人発行、等」に記載の方法）に従って取得することができる。

【0102】

例えば、本発明のモノクローナル抗体は、いわゆる細胞融合によって製造されるハイブリドーマ（融合細胞）から製造することができる。すなわち、抗体産生細胞と骨髓腫系細胞から融合ハイブリドーマを形成し、当該ハイブリドーマをクローン化し、本発明のタンパク質のアミノ酸配列の一部または全部を有する（ポリ）ペプチドを抗原として、それに対して特異的親和性を示す抗体を生産するクローンを選択することによって製造される。その操作は免疫抗原として本発明のタンパク質のアミノ酸配列の一部または全部を有する（ポリ）ペプチドを使用する以外は、従来既知の手段を用いることができる。

【0103】

免疫抗原は、例えば本発明のタンパク質のアミノ酸配列の一部または全部を有する（ポリ）ペプチドと完全フロインドアジュバンドとを混和して調製される。免疫化の対象として用いられる動物としては、マウス、ラット、モルモット、ハムスターまたはウサギ等の哺乳動物、好ましくはマウスまたはラット、より好ましくはマウスが例示される。免疫は、これらの哺乳動物の皮下内、筋肉内、静脈内、フッドパット内、または腹腔内に1乃至数回注射することにより行われる。

【0104】

通常、初回免疫から約1～2週間毎に1～4度免疫を行い、さらに約1～4週間後に最終免疫を行って、最終免疫より約3～5日後に免疫感作された動物から抗体産生細胞が採取される。

【0105】

これにより調製された本発明のモノクローナル抗体は、例えば、自己免疫疾患などリンパ球が関与する疾患の検出や治療などに利用することが可能である。

【0106】

本発明のモノクローナル抗体には、「国際寄託番号 FERM BP-5707」のハイブリドーマが産生するモノクローナル抗体（JTT.1抗体）もしくはその一部または該抗体と実質的に同一の性状を有する抗体、および「国際寄託番号 FERM BP-5708」のハイブリドーマが産生するモノクローナル抗体（JTT.2抗体）もしくはその一部または該抗体と実質的に同一の性状を有する抗体が含まれる。「JTT.1抗体」は、リンパ球系細胞の凝集作用を有するため、例えば、リンパ球活性化療法などに利用することが可能である。一方、「JTT.2抗体」は、「JTT.1抗体」による凝集作用を阻害するという特性を有するため、例えば、自己免疫疾患などによる細胞接着を阻害するなどの利用が考えられる。

【0107】

また、本発明は、「国際寄託番号 FERM BP-5707」のハイブリドーマおよび「国際寄託番号 FERM BP-5708」のハイブリドーマに関する。

【0108】

本発明のハイブリドーマは、公知の方法で調製することが可能である。公知の方法としては、例えば、モノクローナル抗体を分泌するハイブリドーマの調製には、ケーラー及びミルシュタインらの方法（Nature, Vol. 256, pp. 495-497, 1975）及びそれに準じる修飾方法が挙げられる。すなわち、本発明のモノクローナル抗体は、前述の如く免疫感作された動物から取得される脾臓、リンパ節、骨髓あるいは扁桃等、好ましくは脾臓に含まれる抗体産生細胞と、好ましくは同種のマウス、ラット、モルモット、ハムスター、ウサギまたはヒト等の哺乳動物、より好ましくはマウス、ラットまたはヒトの骨髓腫系細胞（ミエローマ）との融合により得られる融合細胞（ハイブリドーマ）を培養することにより調製される。培養は、インビトロ、またはマウス、ラット、モルモット、ハムスターもしくはウサギ等の哺乳動物、好ましくはマウスまたはラット、より好ましくはマウスの腹水中等でのインビボで行うことができ、抗体はそれぞれ該培養上清、または哺乳動物の腹水から取得することができる。

【0109】

細胞融合に用いられる骨髓腫系細胞としては、例えばマウス由来ミエローマ「P3/X63-AG8」、「P3/NS1/1-Ag4-1」、「P3/X63-Ag8.U1」、「SP2/0-Ag14」、「F

0) または「BW5147」、ラット由来ミエローマ「210RCY3-Ag1.2.3」、ヒト由来ミエローマ「U-266AR1」、「GM1500-6TG-A1-2」、「UC729-6」、「PA1」、「CEM-AGR」、「D1R11」または「CEM-T15」を挙げることができる。

【0110】

本発明のモノクローナル抗体を産生する融合細胞クローンのスクリーニングは、融合細胞を、例えばマイクロタイタープレート中で培養し、増殖の見られたウェルの培養上清の抗原に対する反応性を、例えば、フローサイトメーター、RIAやELISA等の酵素抗体法によって測定することにより行うことができる。

【0111】

モノクローナル抗体の精製、単離は、上述のような方法によって取得される本発明のモノクローナル抗体を含有する血清、腹水あるいはイオン交換クロマトグラフィー (DEAEまたはDE52など)、抗イムノグロブリンカラムあるいはプロテインAカラム等のアフィニティーカラムクロマトグラフィーに付すること、または、カプロイン酸を添加することにより行うことができる。

【0112】

本発明の「モノクローナル抗体」は、上述の製造方法に限定されることなく、いかなる方法で得られたものであってもよい。また、通常「モノクローナル抗体」は、免疫感作を施す哺乳動物の種類によりそれぞれ異なる構造の糖鎖を有するが、本発明における「モノクローナル抗体」は該糖鎖の構造差異により限定されるものではなく、あらゆる哺乳動物由来のモノクローナル抗体をも包含するものである。さらに、例えばヒトイムノグロブリン遺伝子を組み込むことにより、ヒト型抗体を産生するように遺伝子工学的に作出されたトランスジェニックマウスを用いて得られるヒト型モノクローナル抗体、あるいは、遺伝子組換え技術により、ある哺乳動物由来のモノクローナル抗体の定常領域 (Fc領域) をヒトモノクローナル抗体のFc領域と組み換えたキメラモノクローナル抗体、さらには抗原と相補的に直接結合し得る相補性決定部位 (CDR: complementarity-determining residue) 以外、全領域をヒトモノクローナル抗体の対応領域と組換えたキメラモノクローナル抗体も本発明の「モノクローナル抗体」に包含される。

【0113】

本発明において「抗体の一部」とは、少なくとも一つの可変領域を含有する抗体フラグメントの意であり、前述の本発明における抗体、好ましくはモノクローナル抗体の一部分の領域を意味し、具体的にはFv、F(ab')₂、Fab'あるいはFabを指す。ここで、「F(ab')₂」及び「Fab'」とは、イムノグロブリン（モノクローナル抗体）をタンパク質分解酵素であるペプシンあるいはパパイン等で処理することにより製造され、ヒンジ領域中の2本のH鎖間に存在するジスルフィド結合の前後で消化されて生成される抗体フラグメントを意味する。例えば、IgGをパパインで処理すると、ヒンジ領域中の2本のH鎖間に存在するジスルフィド結合の上流で切断されてVL（L鎖可変領域）とCL（L鎖定常領域）からなるL鎖、及びVH（H鎖可変領域）とCH_γ1（H鎖定常領域中のγ1領域）とからなるH鎖フラグメントがC末端領域でジスルフィド結合により結合した相同な2つの抗体フラグメントを製造することができる。これら2つの相同な抗体フラグメントをそれぞれFab'という。また、IgGをペプシンで処理すると、ヒンジ領域中の2本のH鎖間に存在するジスルフィド結合の下流で切断されて前記2つのFab'がヒンジ領域でつながったものよりやや大きい抗体フラグメントを製造することができる。この抗体フラグメントをF(ab')₂という。

【0114】

なお、本明細書または図面においてアミノ酸を表記するために用いられるアルファベットの三文字あるいは一文字は、次に示すアミノ酸を意味する。

(Gly/G) グリシン、(Ala/A) アラニン、(Val/V) バリン、(Leu/L) ロイシン、(Ile/I) イソロイシン、(Ser/S) セリン、(Thr/T) スレオニン、(Asp/D) アスパラギン酸、(Glu/E) グルタミン酸、(Asn/N) アスパラギン、(Glu/Q) グルタミン、(Lys/K) リジン、(Arg/R) アルギニン、(Cys/C) システイン、(Met/M) メチオニン、(Phe/F) フェニルアラニン、(Tyr/Y) チロシン、(Trp/W) トリプトファン、(His/H) ヒスチジン、(Pro/P) プロリン。

【0115】

本発明のタンパク質および抗体は、疾患治療、特に各種炎症性疾患（リウマチ、変形性関節症、炎症性大腸疾患、腎炎、肝炎、心筋炎等）の診断、予防および

治療などのために用いることが可能である。本発明のタンパク質または該タンパク質に対する抗体は通常、全身または局所的に、一般的には経口または非経口の形で投与することができる。好ましくは非経口投与であり、非経口投与の内でも特に好ましくは静脈内投与である。

【0116】

投与量は、年齢、性別、体重、症状、治療効果、投与方法、処理時間、投与するもの（全長のタンパク質、該タンパク質の一部を置換、欠失、挿入したタンパク質、該タンパク質の抗体の種類）などにより異なるが、通常成人一人当たり、一回につき100 μ gから100mgの範囲で、一日一回から複数回経口投与されるかまたは、成人一人当たり、一回につき10 μ gから100mgの範囲で、一日一回から複数回非経口投与することができるだろう。投与量は種々の条件により変動するため、上記投与量より少ない量で十分な場合もあり、また上記の範囲を越える投与量が必要な場合もある。本発明による非経口投与のための注射剤としては、無菌の水性または非水性の溶液剤、懸濁剤、乳濁剤などを包含する。水性または非水性の溶液剤、懸濁剤としては、一つまたはそれ以上の活性物質が、少なくとも一つの不活性な希釈剤として混合される。水性の希釈剤としては、例えば注射用蒸留水および生理食塩水などが挙げられる。非水性の希釈剤としては、例えばプロピレングリコール、ポリエチレングリコール、オリーブ油のような植物油、エタノールのようなアルコール類などが挙げられる。

【0117】

このような組成物は、さらに防腐剤、湿潤剤、乳化剤、分散剤、安定化剤（例えばアルギニン、アスパラギン酸など）のような補助剤を含んでいてもよい。

【0118】

これらはバクテリア保留フィルターを通す濾過、殺菌剤の配合または照射によって無菌化される。これらはまた無菌の固体組成物を例えば凍結乾燥法などによって製造し、使用前に無菌の注射用蒸留水または他の溶媒に溶解して使用することもできる。

【0119】

非経口投与のためのその他の組成物としては、一つまたはそれ以上の活性物質

を含み、常法により処方される外用液剤、腸溶内投与のための坐剤およびベツサ
リーなどが含まれる。

【0120】

以下、本発明を実施例によりさらに詳細に説明するが、本発明はこれら実施例
に制限されるものではない。

【0121】

【実施例】

【実施例1】 モノクローナル抗体の調製

以下に述べる抗体産生ハイブリドーマの調製は、ケーラー (Kohler) らの方法
(Blood、第81巻、101-111ページ、1993年、大森ら) を参照しながら行い、また
、モノクローナル抗体の調製は神奈木らの方法 (Handbook of Experimental Imm
unology、第4巻、117.21-117.21ページ、1986年) を参照しながら行った。

【0122】

まず、ラット胸腺腫細胞株FTL435細胞を免疫感作抗原として、該抗原をBalb/c
マウスに0日目 (10^7 /匹)、7日目、14日目および28日目という間隔及び量でフッ
トパッド投与した。初回免疫のみ該抗原をフロイント完全アジュバントと混和し
たものを投与した。最後の免疫感作から2日後に該マウスのリンパ節を採取し、
常法によりマウスミエローマ細胞PAI (Stocker, J.W. et al. Res. Disclosure, 217
:155(1982)) と融合させた。得られたハイブリドーマの各々の培養上清を、免疫
原であるFTL435細胞に添加し、細胞凝集能を有するハイブリドーマクローンを取
得し、ハイブリドーマクローン「JTT.1」と命名した。さらに上記と同様の手法
により、FTL435細胞の「JTT.1」による凝集を抑制する活性を有するハイブリ
ドーマクローンを取得し、ハイブリドーマクローン「JTT.2」と命名した。なお、
これらのハイブリドーマは通産省工業技術院生命工学工業技術研究所に寄託した
(寄託番号: FERM BP-5707, FERM BP-5708)。また、常法に従って上記ハイブリ
ドーマクローンからそれぞれモノクローナル抗体 (寄託番号 FERM BP-5707から
調製されるものを「JTT.1抗体」、寄託番号 FERM BP-5708から調製されるものを
「JTT.2抗体」と称する) を調製し、マウスモノクローナル抗体アイソタイプ同
定キット (Amersham社製) を用いてアイソタイプを同定したところ、「JTT.1抗

体」および「JTT.2抗体」のイムノグロブリンクラスはいずれもIgG1であった。

【0123】

【実施例2】 「JTT.1抗体」のFTL435細胞凝集誘導作用および「JTT.2抗体」の細胞凝集抑制作用

実施例1で調製したモノクローナル抗体のFTL435細胞におよぼす効果を解析した。96穴マイクロタイタープレートの各ウェルにFTL435細胞 (5×10^6 cell/ml) を0.1ml)、及び「JTT.1抗体」または「JTT.2抗体」(それぞれ10 μ g/ml)を加え、37℃で1時間培養した。なお、対照として「JTT.1抗体」または「JTT.2抗体」の代わりに抗ラット「ICAM-1」抗体 (10 μ g/ml; IgG1(Tamatani, T. and Miyasaka, M., Int. Immunol. 1990. 2: 165))を用いて同様に測定した。

【0124】

その結果を図1に示す。「JTT.1抗体」は、FTL435細胞を強く凝集させる作用を持つことが確認された(図1右上)。この凝集は、抗ラット「ICAM-1」抗体(図には「1A29」として示した)により阻害されなかった(図1左下)。また「JTT.2抗体」は、「JTT.1抗体」によるFTL435細胞の凝集を強く抑制する作用を持つことが確認された(図1右下)。なお、図には示していないが抗ラット「LFA-1」抗体 (10 μ g/ml)を用いた場合でも、「JTT.1抗体」によるFTL435細胞の凝集は阻害されなかった。

【0125】

【実施例3】 「JTT.1抗体」及び「JTT.2抗体」の各種細胞に対する反応性
各種細胞における「JTT.1抗体」及び「JTT.2抗体」の認識する分子の発現パターンを解析する目的で、各種細胞における抗体の反応性を確認した。

【0126】

5~10週齢ウイスターラット (150~250g) をジエチルエーテルにて麻酔死させた。胸部を開腹して胸腺を、腹部を開腹して脾臓を摘出し、すりつぶし細胞浮遊液を調製した。更に、脾細胞をコンカナバリンA (2 μ g/ml) 及び10%FCSを含むRPMI1640培地中で37℃、3日間培養することにより、活性化リンパ球を調製した。

【0127】

FTL435細胞、胸腺細胞、脾細胞及び活性化リンパ球 (各 5×10^5 個) を「JTT.1

抗体」または「JTT.2抗体」と反応させ、次いでFITC標識抗マウスIgG (Cappel社製) 反応させた後、染色された細胞の蛍光強度をエピックスエリート (EPICS-Elite) フローサイトメーターを用いて測定した。

【0128】

結果を図2に示す。FTL435細胞では、「JTT.1抗原」及び「JTT.2抗原」の強い発現がみられた。胸腺細胞でも同分子の発現がみられたが、脾細胞ではわずかにしか発現していなかった。しかし、脾細胞をコンカナバリンAで活性化して得られる活性化リンパ球については、「JTT.1抗原」及び「JTT.2抗原」の強い発現がみられるようになった。また「JTT.1抗原」及び「JTT.2抗原」の発現パターンは、ほぼ一致していた。

【0129】

[実施例4] 免疫沈降実験による「JTT.1抗原」及び「JTT.2抗原」の性状解析
「JTT.1抗原」及び「JTT.2抗原」の性状を解析する目的で、FTL435細胞を用いて免疫沈降実験を行った。

(1) 細胞表面分子のビオチン化

FTL435細胞をPBSで洗浄した後、 $100\mu\text{g/ml}$ のNHS-ビオチンを含む 0.1M ヘプス含有生理食塩水 (pH8.0) に 1×10^7 細胞/mlになるよう懸濁し、室温で40分間反応させた。細胞をPBSで3回洗浄した後、可溶化バッファー ($1\%\text{NP-40}$ 、 10mM Tris-HCl (pH7.4)、 0.15M NaCl) を 5×10^7 cells/mlになるように添加し、 4°C 、30分間溶解した。可溶化物を遠心後、上清を -80°C で保存した。

(2) 免疫沈降及びSDS-PAGE解析

実施例1で調製した「JTT.1抗体」の精製標品 2mg/ml になるようにプロテインG-セファロースと混合し、 4°C で1時間結合させた。ビーズを洗浄し、 $10\mu\text{l}$ のビーズに対しビオチン化FTL435細胞可溶化物を $500\mu\text{l}$ 添加し、 4°C で2時間反応させた。ビーズを可溶化バッファーで3回洗浄し、グリカナーゼバッファー ($0.15\%\text{SDS}$ 含有ナトリウムリン酸バッファー (pH7.0)) $50\mu\text{l}$ 加え煮沸することにより結合分子を溶出した。溶出サンプルの一部に $1.25\%\text{NP-40}$ とN-グリカナーゼ (20U/ml) を添加し一晩反応させ、N型糖鎖を消化した。

【0130】

溶出サンプル5 μ lに2-メチルカプトエタノール存在あるいは非存在のSDS-ポリ
 アクリルアミドゲル電気泳動 (SDS-PAGE) 用サンプルバッファー (Enprotech社
 製) を等量添加して煮沸し、SDS-PAGE後、PVDF膜に転写した。ビオチン化蛋白質
 は、ペルオキシダーゼ標識ストレプトアビジンと反応させた後、使用説明書の記
 載に従いECLシステム (Amersham社製) を用いて検出した。

【0131】

図3に結果を示す。「JTT.1抗体」は、SDS-PAGEによりFTL435細胞上の、非還元
 下 (図3中に「(-)」で示した) で47kD、還元下 (図3中に「(+)」で示した) で24
 kDおよび28kDの2つの分子を認識した。またN型糖鎖を消化を行うことにより (図
 3中に「+N-gly」で示した)、「JTT.1抗原」は、非還元下で36kD、還元下で20kD
 の1本のバンドに収束した。以上の結果から、「JTT.1抗原」は、糖鎖修飾が異な
 りコア蛋白が同一の分子からなるダイマーを形成していると推定された。なお、
 「JTT.2抗体」を用いても全く同様の結果が得られた。本実施例および後述の実
 施例6の結果を考え合わせると、「JTT.1抗原」及び「JTT.2抗原」は全く同一の
 分子であると考えられる。

【0132】

[実施例5] 精製「JTT.1抗原」に対するラット胸腺細胞の接着実験

「JTT.1抗体」が認識する分子が接着分子として機能するかどうかを解析する
 ため以下の実験を行った。

(1) 「JTT.1抗体」カラムの調製

実施例1で調製した「JTT.1抗体」の精製標品2mg(2ml)を1mlのプロテインG-セ
 ファロースと混合し、4℃で1時間結合させた。樹脂を200mMのトリエタノールア
 ミン (pH8.2) で3回洗浄した。さらに、10mMジメチルピメリミデート (DMP) を
 含むトリエタノールアミン (pH8.2) 中で室温1時間インキュベートすることによ
 り、樹脂に「JTT.1抗体」を共有結合させた。

(2) 「JTT.1抗原」の精製

FTL435細胞を10%FCS含有RPMI1640培地を用いて培養した。細胞を遠心操作によ
 り回収し、ペレットをPBSにて3回洗浄した。洗浄後のペレットに可溶化バッファ
 ー (1%NP-40、10mMTris-HCl(pH7.4)、0.15MNaCl) を 5×10^7 cells/mlになるよう

に添加し、4℃で30分間溶解した。可溶化物を遠心後、上清を-80℃で保存した。

【0133】

可溶化物400mlを「JTT.1抗体」カラム(1ml)に添加した。カラムを可溶化バッファー50ml及びPBS20mlで洗浄した後、0.2Mグリシンバッファーを添加して中和した。得られた「JTT.1抗原」は、-80℃で保存した。

(3) 接着実験

5~10週齢ウイスターラット(150~250g)をジエチルエーテルにて麻酔死させた。胸部を開腹して胸腺を摘出し、すりつぶして胸腺細胞浮遊液を調製した。細胞浮遊液に、2', 7'-ビス(カルボキシエチル)カルボキシフルオレインテトラセトキシメチルエステル(Molecular Probes社製)10 μ Mを添加し、37℃で30分間培養することにより、蛍光標識を行った。細胞をPBSで洗浄した後、10%FCSを含むRPMI1640培地中に、 2×10^7 /mlの濃度になるように再浮遊させた。

【0134】

96穴ライザプレートに、(2)で得た精製「JTT.1抗原」を10 μ l/穴で一晩コートした。プレートをPBSで洗浄した後、3%BSAを含むPBSを200 μ l/穴添加し2時間ブロッキングを行った。プレートをPBSで洗浄した後、各ウェルに蛍光標識胸腺細胞(2×10^7 cells/mlを0.1ml)、及びFab化した「JTT.1抗体」(5 μ g/ml)および「JTT.2抗体」(10 μ g/ml)を加え、37℃で一時間培養した。結合していない細胞を除去するために、各ウェルを10%FCSを含むRPMI1640培地にて一回洗浄した。各ウェルを光学顕微鏡で観察した後、結合している細胞を0.1%NP-40溶液100 μ lで溶解した。フルオロスキャンIIマイクロプレート フルオロメーター(Flow Laboratories社製)を用いて、538nm(485nmで励起)での蛍光強度を測定することにより、各ウェルの相対細胞数を計数した。

【0135】

光学顕微鏡観察の結果を図4に示す。図4中の「Ag(-)」は、「JTT.1抗原」でコートしないウェルを用いたもので、「Ag(+)」は該抗原でコートしたウェルを用いたものである。この結果、胸腺細胞は、Fab化「JTT.1抗体」存在下でのみ有意に精製「JTT.1抗原」に接着した(左下図)。またその接着は、「JTT.2抗体」により有意に阻害された(右下図)。

【0136】

なお、各ウェルの「JTT.1抗原」に接着した胸腺細胞数を蛍光強度により測定した結果を図5に示した。

【0137】

以上の結果により、「JTT.1抗原」は、接着分子として機能することが確認された。

【0138】

[実施例6]: ラット「JTT.1抗原」cDNAのクローニング

1. cDNAライブラリーの作製

(1) ラット脾細胞Con A blastからpoly(A)⁺RNAの抽出

ラット脾細胞Con A blast (約 1×10^6 /ml) を $2,000 \times g$ で5分間4℃で遠心して、沈殿した細胞をISOGEN (ニッポンジーン社製) を用いて懸濁し、クロロホルムで浸とう抽出して上清を回収した。得られた上清にイソプロパノールを添加して室温で10分間放置した後、4℃で10分間、 $12,000 \times g$ にて遠心し、RNAを沈殿させた。沈殿したRNAをエタノールで洗浄した後、TE緩衝液に溶解した。得られた全RNAから、「mRNA Purification Kit」(Pharmacia社製) を用いてpoly(A)⁺RNAを精製した。

【0139】

(2) cDNAライブラリーの作製

調製したpoly(A)⁺RNA5 μg を鋳型とし、「Time Saver cDNA Synthesis Kit」(Pharmacia社製)を用いてcDNAを合成した。スクリーニングの効率を上げるため、Not I切断部位を有する「oligo dTプライマー」(Pharmacia社製)を用いた。Eco RIをアダプター付加後にNot I消化を行い、単一方向性を有するcDNAを得た。更にスパンカラム (Pharmacia社製) を用いてサイズ分画を行った。

【0140】

(3) ベクターへの組み込み

得られたEcoRIおよびNotI末端を有するcDNAを、EcoRIおよびNotI処理したベクターpME18S (Hara, T. and Miyajima, A. EMBOJ., 11, 1875-1884, 1992) に連結した。連結反応には「DNA ligation Kit」(宝酒造社製) を用いた。得られた反応生

成物を用いて「E.coli DH10B」(GIBCO BRL社製)を形質転換した。形質転換体は「O.D.600nm=0.6」になるまで培養した後、集菌しライブラリーを含むプラスミドDNAを回収した。プラスミドDNAの精製にはQUIAGEN-Tip (QUIAGEN社製)を用いた。

【0141】

2. cDNAライブラリーのスクリーニング

スクリーニング法はパニング法 (Seed, B. et al. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 84, 3365-3369, 1987) に準じて行った。

【0142】

(1) COS細胞への遺伝子導入

得られたライブラリーをエレクトロポレーション法 (Potter, H. et al. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 85, 2288-2292) によりCOS7細胞に導入した。導入後60時間培し、上清を除去しPBSで3回洗浄した。PBS-0.5mM EDTAを37℃、30分処理した後ピペッティングして細胞を剥がした。さらに「Lymphprep」(NYCOMED社製)を用いて生細胞のみを回収した。

【0143】

(2) パニングによる遺伝子発現細胞の濃縮

得られた生細胞をPBS-5%FCS-0.5mM EDTAに懸濁した。細胞懸濁液を「JTT.1抗体」をコートした培養皿に移し、室温で3時間作用させた。非結合細胞を除去しPBSで3回洗浄した後、培養皿に結合した細胞からHirt法 (Hirt, B. J. Mol. Biol., 26, 365-369) によりプラスミドDNAを回収した。得られたプラスミドDNAを用いてE. coli DH10B (GIBCO BRL社製)を形質転換した。形質転換体を用いて上記(実施例6-1-(3))と同様にプラスミドDNAを増幅、精製した。得られたDNAを用いて、(1)、(2)に記載の操作を更に2回繰り返し行った。

【0144】

(3) ポジティブクローンの単離

3回目のパニング後、形質転換したE. coli DH10Bをアンピシリン含有LB plateで終夜培養しコロニーを得た。薬剤耐性コロニー20個を培養しアルカリ・ミニプレップ法 (Maniatis, T. et al. Molecular Cloning; A Laboratory Manual, Cold Spr

ing Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York) でプラスミドDNAを回収し、インサートDNAを解析した。アガロースゲル電気泳動の結果、約0.9kbのcDNAを有するクローン（以下、このクローンを「T132A7」と称する）が濃縮されていることが明らかとなった。

【0145】

(1)に記載の方法を用いて、「T132A7」を再びCOS7細胞で一過性発現させた。「T132A7」導入細胞を「JTT.1抗体」及び「JTT.2抗体」で染色し、EPICS ELITE (Coulter社製)を用いて分析した。「JTT.1抗体」及び「JTT.2抗体」は「T132A7」遺伝子産物を強く認識していた(図6)。

【0146】

(4) N末端のアミノ酸配列の決定

大量のFTL435細胞の細胞可溶化物から「JTT.1抗体」カラムを用いてこの分子を通常の方法(実験医学別冊 細胞工学ハンドブック(1992))で精製し、SDS-PAGEで展開後、N末端のアミノ酸配列を決定した。その結果は、「Glu-Leu-Asn-Asp-Leu-Ala-Asn-His-Arg」であった。

【0147】

一方、クローニングした遺伝子から予想されるアミノ酸配列も同一のN末端配列を含んでいた。

【0148】

さらに、遺伝子導入細胞は、「JTT.1抗体」と反応した。以上の結果より、クローニングされた遺伝子は、ラット「JTT.1抗原」遺伝子である。

【0149】

3. 塩基配列決定

クローン「T132A7」について「Auto Read Sequencing Kit」(Pharmacia社製)と「A.L.F. DNA sequencer」(Pharmacia社製)を用いてジデオキシ法により塩基配列を決定した。これに実施例6-2の結果を考え合わせると、クローン「T132A7」は「JTT.1抗原」cDNAであると考えられた。

【0150】

4. コンピューター解析

実施例6-3で得られた塩基配列から「JTT.1抗原」の推定アミノ酸配列を遺伝子解析ソフト「GENEWORKS」(IntelliGenetics社製)を用いて解析した。ハイドロパシー・プロット解析はKiteとDoolittleの方法(Kite, J. & Doolittle, R. F. J. Mol. Biol. 157, 105-132, 1982)に従って行った(図7)。その結果、「JTT.1抗原」はN末端にシグナル配列を有する膜タンパク質であることが明らかとなった。モチーフ解析の結果、「JTT.1抗原」の細胞外ドメインに2カ所のアスパラギン結合型糖鎖結合部位、細胞内ドメインにカゼインキナーゼリン酸化部位が2カ所、プロテインキナーゼCリン酸化部位が1カ所存在していることが明らかとなった。なお、図7中の「CHO」はN型糖鎖結合部位を示し、「P」はリン酸化部位を示し、「CKII」はカゼインキナーゼIIを示し、「PKC」はプロテインキナーゼCを示す。

【0151】

【実施例7】 ヒト「JTT.1抗原」cDNAのクローニング

1. プローブの作製

実施例6-3で得られたクローン「T132A7」を制限酵素EcoRIおよびNotIで消化して、ラット「JTT.1抗原」cDNA約0.9kbを切り出し、アガロースゲル電気泳動により分離した。分離したDNA断片は「QUIAEX gel extraction kit」(QUIATEN社製)を用いて精製し、「Ready-To-Go DNA labelling kit」(Pharmacia社製)を用いて該DNA断片を³²Pで標識した。この標識DNA断片をブランクハイブリダイゼーション用のプローブとして用いた。

【0152】

2. cDNAライブラリーの作製

(1) ヒト末梢血Con A blastからpoly(A)⁺RNAの抽出は上記(実施例6-1-(1))と同様に行った。

【0153】

(2) cDNAライブラリーの作製

調製したpoly(A)⁺RNA 5μgを鋳型とし、「oligo dTプライマー」(Pharmacia社製)と「Time Saver cDNA Synthesis Kit」(Pharmacia社製)を用いてcDNAを合成した。EcoRIアダプター付加後にスパンカラム(Pharmacia社製)を用いてサ

イズ分画を行った。

【0154】

(3) ベクターへの組み込み及びパッケージング

得られたEcoRI末端を有するcDNAを、EcoRI処理したベクター「λZAPII」(Stratagene社製)に連結した。連結反応には「DNA ligation Kit」(宝酒造社製)を用いた。これを「GIGA PACK II GOLD」(Stratagene社製)を用いてインビトロパッケージング (in vitro packaging) した後、得られたファージ粒子を用いて、E coli XL1Blue MRF' (Stratagene社製)を宿主として組換えファージを含有するブランクからなるcDNAライブラリーを作製した。

【0155】

(4) 形質転換体の作製

(3) で得られた反応性生物を用いて実施例6-1-(3)と同様にして「E.coli.DH10B」(GIBCO BRL社製)を形質転換した。この形質転換体は通産省工業技術院生命工学技術研究所に寄託した(寄託番号:FERM BP-5725)。

【0156】

3. cDNAライブラリーのスクリーニング

スクリーニングは「Rapid hybridization buffer」(Amersham社製)を用いたブランクハイブリダイゼーション法 (Maniatis, T. et al. Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York) に従い行った。得られたライブラリーを寒天プレートに 1×10^4 まき、「Hybond-N nylon membrane」(Amersham社製)でレプリカを作製した。レプリカと実施例7-1で作製した ^{32}P 標識プローブを用い、「Rapid hybridization buffer」(Amersham社製)中でブランクハイブリダイゼーションを行った。1次スクリーニング及び2次スクリーニングを行い、8個のポジティブ・クローンを得た。各クローンをシングルブランクで単離後、マニュアル (Stratagene社) に従ってインビボエキサイション (in vivo Excision) に供し、7クローンをプラスミドDNAとして回収した。

【0157】

4. 塩基配列決定

7個のクローンについて「Auto Read Sequencing Kit」(Pharmacia社製)と「A.L.F.DNA sequencer」(Pharmacia社製)を用いてジデオキシ法により塩基配列を決定した。7個のクローンはすべて同じ塩基配列を含んでいた。また、得られた塩基配列を、ラット「JTT.1抗原」の配列と比較した結果、有意な相同性を示したためラット「JTT.1抗原」のヒト・ホモログ(ヒトJTT.1抗原)をコードしていると考えられた(図8)。このうちクローン「pBSh41」(配列番号:1)はヒト「JTT.1抗原」の全長をコードしていることが確認された。ヒト「JTT.1抗原」の推定アミノ酸配列を配列番号:2に示す。また、図7によれば、ヒト、マウス、ラットの「JTT.1抗原」の相同性は、60%以上であることがわかる。

【0158】

【実施例8】 ヒト「JTT.1抗原」タンパク質に対するモノクローナル抗体の調製
実施例7-2-(4)の形質転換体(該形質転換体は、ヒト「JTT.1抗原」を発現を発現している)を用いて実施例1と同様にしてマウスに免疫し、モノクローナル抗体(ヒト「JTT.1抗原」に対する抗体)を得た。

【0159】

【発明の効果】

本発明のタンパク質は、免疫系に関する活性化リンパ球に強く発現し、静止期リンパ球にはほとんど発現せず、好中球などには全く発現しないタンパク質であることから、本発明のタンパク質を定量または定性することにより各種炎症性疾患(リウマチ、変形性関節症、炎症性大腸疾患、腎炎、肝炎、心筋炎等)の程度の診断に利用できる。一方、本発明のタンパク質は細胞接着分子でもあるので、該タンパク質を用いることにより細胞-細胞間または細胞-マトリックス間の接着を阻害することが期待される。

【0160】

また、本発明のタンパク質をコードする遺伝子、該遺伝子を含んでなるベクター、および該ベクターを含んでなる形質転換体は、多大な有用性が期待される本発明のタンパク質を生産する際の重要かつ必須の鋳型となるだけでなく、遺伝病の診断や治療(遺伝子欠損症の治療またはアンチセンスDNA(RNA)によって、ポリペプチドの発現を停止させることによる治療など)に利用できる。

【0161】

さらに、本発明のタンパク質に対する抗体（ポリクローナル抗体又はモノクローナル抗体）は活性化リンパ球に反応を示すことから、該抗体を用いれば生体における本発明のタンパク質の定量を行うことができる。これによって、活性化リンパ球が多く存在している各種炎症性疾患（リウマチ、変形性関節症、炎症性大腸疾患、腎炎、肝炎、心筋炎等）の診断および本発明のタンパク質と疾患との関係の研究等に使用することができる。特に、本発明のタンパク質を凝集させる作用を有する抗体は、炎症性疾患に伴う活性化リンパ球を抑制することから炎症性疾患自体を抑制し、該炎症性疾患の治療薬として使用することが期待される。

【0162】

また、該抗体を産生するハイブリドーマは、多大な有用性が期待される本発明の該抗体を生産する際の重要かつ必須の細胞である。

【0163】

【配列表】

配列番号：1

配列の長さ：600

配列の型：核酸

鎖の数：二本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：cDNA to mRNA

配列

ATGAAGTCAG GCCTCTGGTA TTTCTTTCTC TTCTGCTTGC GCATTAAAGT	50
TTTAACAGGA GAAATCAATG GTTCTGCCAA TTATGAGATG TTTATATTTC	100
ACAACGGAGG TGTACAAATT TTATGCAAAT ATCCTGACAT TGTCCAGCAA	150
TTTAAATGC AGTTGCTGAA AGGGGGGCAA ATACTCTGCG ATCTCACTAA	200
GACAAAAGGA AGTGGAAACA CAGTGTCCAT TAAGAGTCTG AAATTCTGCC	250
ATTCTCAGTT ATCCAACAAC AGTGTCTCTT TTTTCTATA CAACTTGGAC	300
CATTCTCATG CCAACTATTA CTCTGCAAC CTATCAATTT TTGATCCTCC	350
TCCTTTTAAA GTAACCTTTA CAGGAGGATA TTTGCATATT TATGAATCAC	400
AACTTTGTTG CCAGCTGAAG TTCTGGTTAC CCATAGGATG TGCAGCCTTT	450
GTTGTAGTCT GCATTTTGGG ATGCATACTT ATTTGTTGGC TTACAAAAAA	500
GAAGTATTCA TCCAGTGTGC ACGACCCTAA CGGTGAATAC ATGTTTCATGA	550
GAGCAGTGAA CACAGCCAAA AAATCTAGAC TCACAGATGT GACCCTATAA	600

配列番号：2

配列の長さ：199

配列の型：アミノ酸

トポロジー：直鎖状

配列の種類：タンパク質

配列

Met Lys Ser Gly Leu Trp Tyr Phe Phe Leu Phe Cys Leu Arg Ile

1	5	10	15
Lys Val Leu Thr Gly Glu Ile Asn Gly Ser Ala Asn Tyr Glu Met			
20	25	30	
Phe Ile Phe His Asn Gly Gly Val Gln Ile Leu Cys Lys Tyr Pro			
35	40	45	
Asp Ile Val Gln Gln Phe Lys Met Gln Leu Leu Lys Gly Gly Gln			
50	55	60	
Ile Leu Cys Asp Leu Thr Lys Thr Lys Gly Ser Gly Asn Thr Val			
65	70	75	
Ser Ile Lys Ser Leu Lys Phe Cys His Ser Gln Leu Ser Asn Asn			
80	85	90	
Ser Val Ser Phe Phe Leu Tyr Asn Leu Asp His Ser His Ala Asn			
95	100	105	
Tyr Tyr Phe Cys Asn Leu Ser Ile Phe Asp Pro Pro Pro Phe Lys			
110	115	120	
Val Thr Leu Thr Gly Gly Tyr Leu His Ile Tyr Glu Ser Gln Leu			
125	130	135	
Cys Cys Gln Leu Lys Phe Trp Leu Pro Ile Gly Cys Ala Ala Phe			
140	145	150	
Val Val Val Cys Ile Leu Gly Cys Ile Leu Ile Cys Trp Leu Thr			
155	160	165	
Lys Lys Lys Tyr Ser Ser Ser Val His Asp Pro Asn Gly Glu Tyr			
170	175	180	
Met Phe Met Arg Ala Val Asn Thr Ala Lys Lys Ser Arg Leu Thr			
185	190	195	
Asp Val Thr Leu			

【図面の簡単な説明】

【図1】

「JTT.1抗体」または「JTT.2抗体」のFTL435細胞に及ぼす効果を検出した顕微鏡写真である。

【図2】

各種細胞における「JTT.1抗原」及び「JTT.2抗原」の発現をフローサイトメーターを用いて測定した結果を示す図である。

【図3】

「JTT.1抗原」のSDS-PAGEによる解析の結果を示す電気泳動像である。

【図4】

「JTT.1抗原」へのラット胸腺細胞の接着に及ぼす「JTT.1抗体」及び「JTT.2抗体」の効果を示す顕微鏡写真である。

【図5】

「JTT.1抗原」へのラット胸腺細胞の接着に及ぼす「JTT.1抗体」及び「JTT.2抗体」の効果。「JTT.1抗原」へ結合したラット胸腺細胞が発する蛍光により検出した結果を示す図である。

【図6】

COS細胞で発現させた「JTT.1抗原」を「JTT.1抗体」及び「JTT.2抗体」で蛍光染色して、その蛍光強度の検出結果を示す図である。

【図7】

「JTT.1抗原」のアミノ酸配列のハイドロパシープロットの結果を示す図である。

【図8】

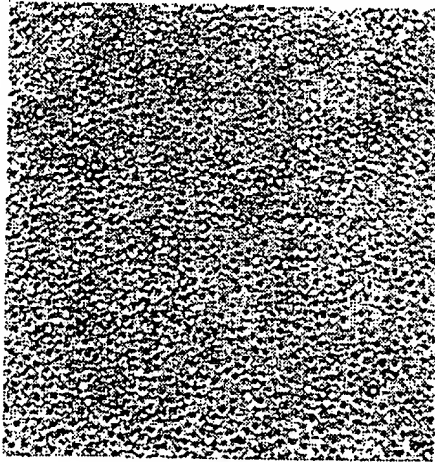
ヒト、ラット、およびマウスの「JTT.1抗原」のアミノ酸配列の比較を示す図である。

【書類名】

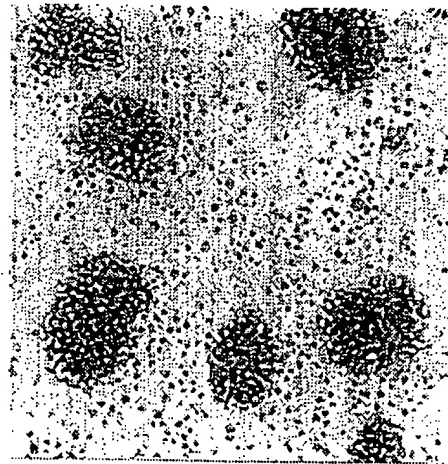
図面

【図1】

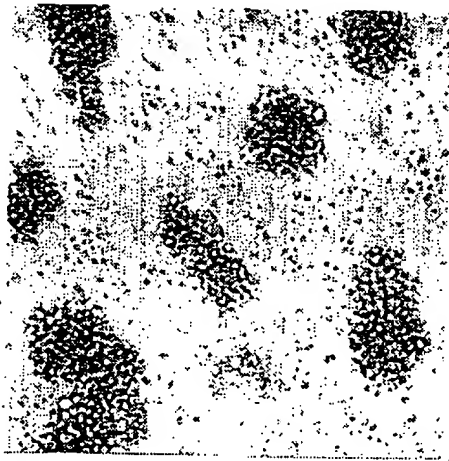
図面代用写真



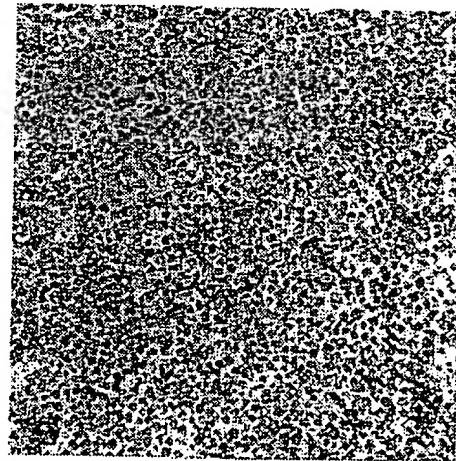
対照



+JTT.1

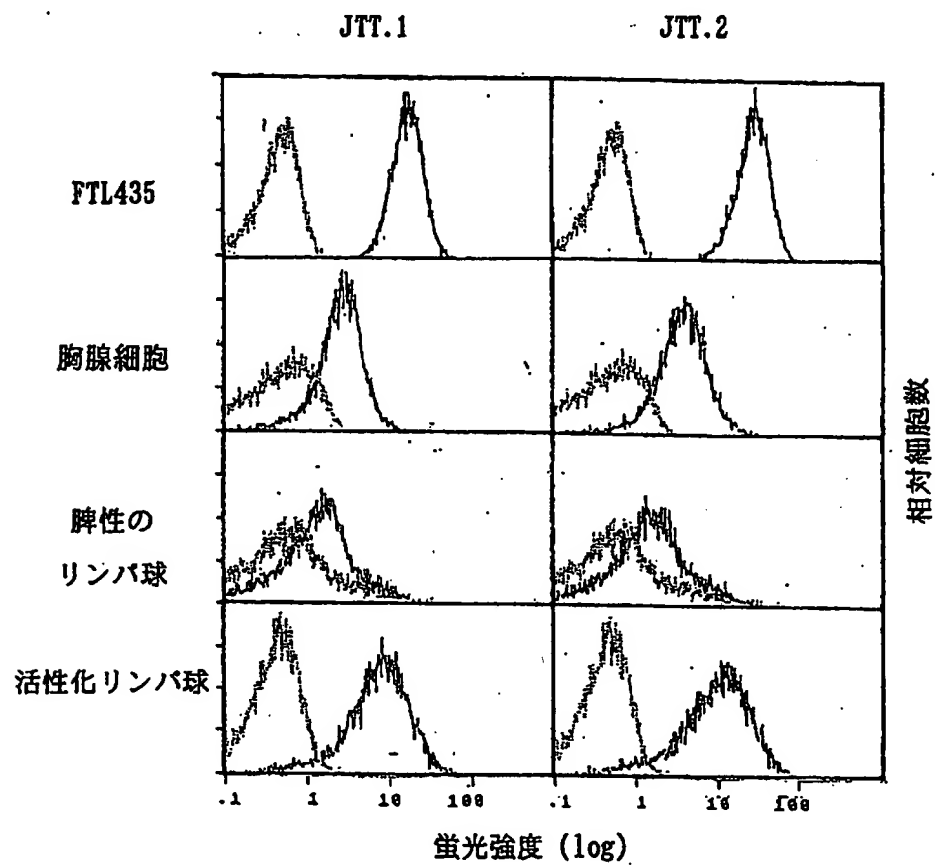


+JTT.1+1A29

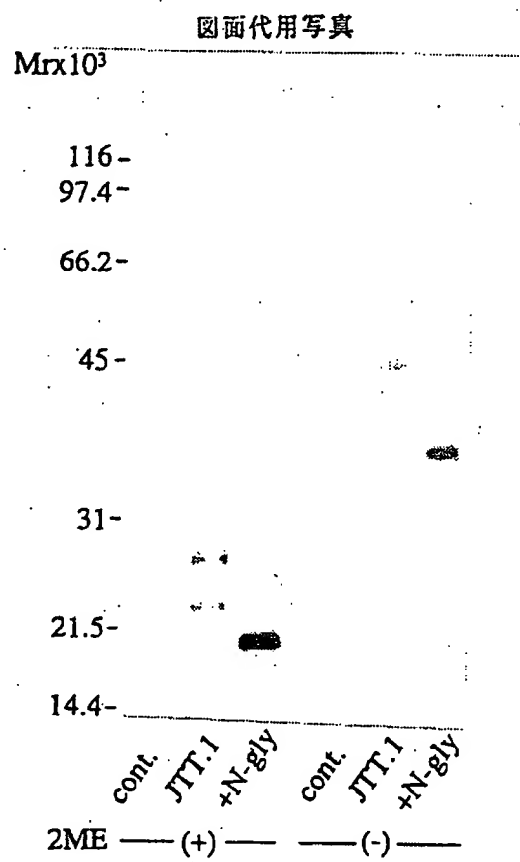


+JTT.1+JTT.2

【図2】

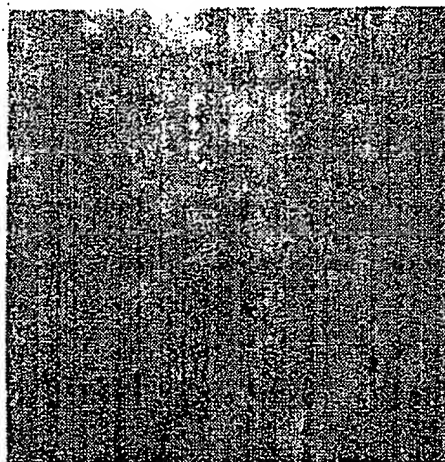


【図3】

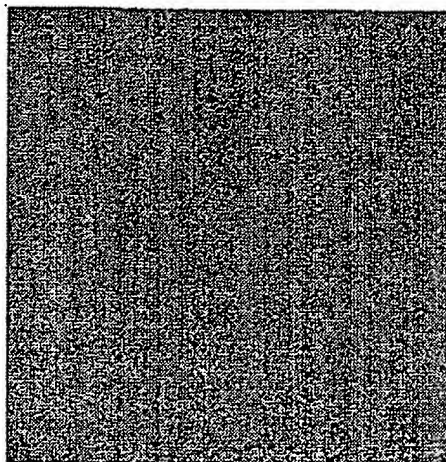


【图4】

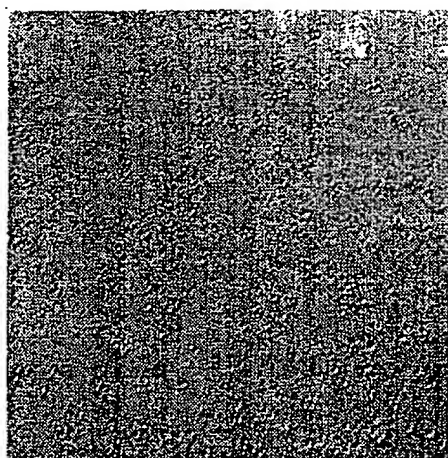
図面代用写真



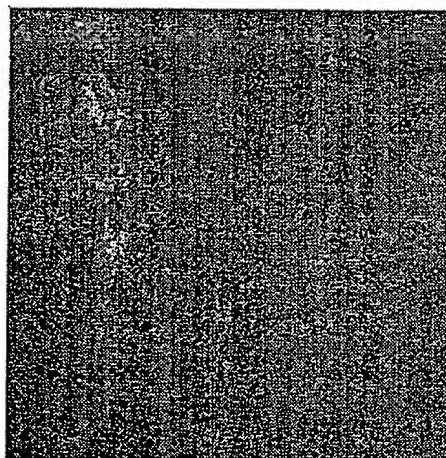
Ag(-) 对照



Ag(+) 对照



Ag(+) + JTT.1 Fab

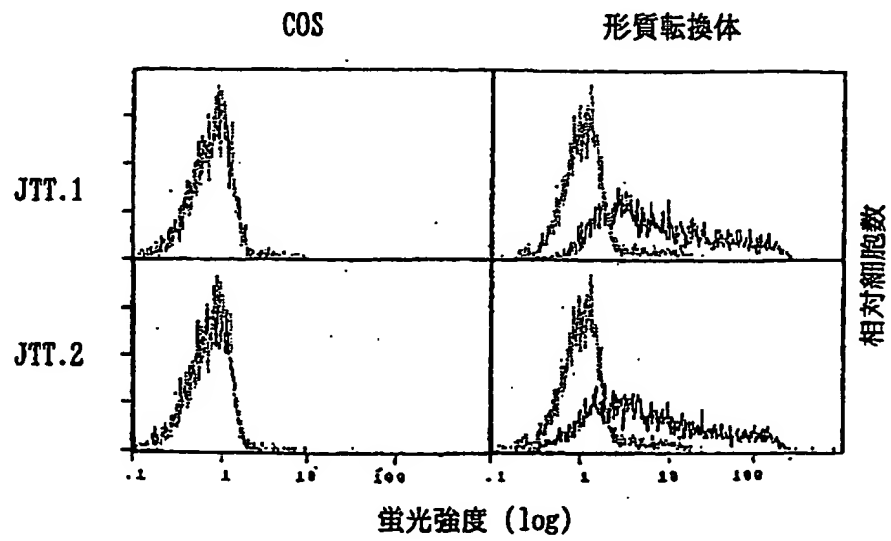


Ag(+) + JTT.1 Fab + JTT.2

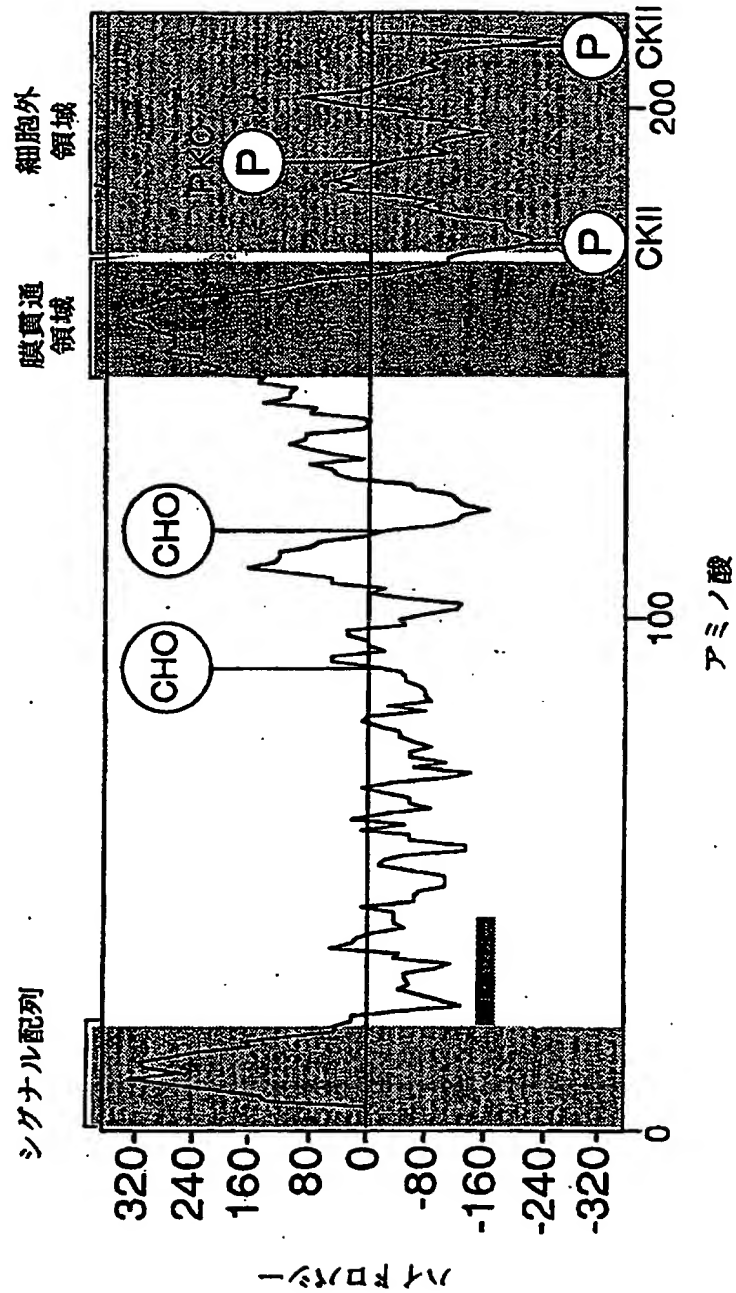
【図5】



【図6】



【図7】



【図8】

ヒット ラウス マウス	MRSGLWYFFL MKPYFSCVFN MKPYFCHVFN MKPYF..VEV	FCFRIKALTG FCFIIKILTG FCFIIIRULTG FCFIIKILTG	EINSSANYEM EINDIANHRM EINSSADHRM EINSSANHRM	FIEHNGGVQI FSEHNGGVQI FSEHNGGVQI FSEHNGGVQI	ICKYFDIVQQ SCNYPETVQQ SCNYPETVQQ SCNYPETVQQ	50 50 50 50
コンセンサス						
ヒット ラウス マウス	FKVILKGGQ IKMILFKORE IKMILFRERE IKMILFK.RE	ILCLLTCTKG VLCILLTCTKG VLCILLTCTKG VLCILLTCTKG	SGNIVSIRSL SGNIVSIRKNE SGNIVSIRKNE SGNIVSIRKNE	KCHSGLSNN MSCPYQLSNN MCLYHLSNN M.C.YQLSNN	SVSFFLANID SVSFFLANID SVSFFLANID SVSFFLANID	100 100 100 100
コンセンサス						
ヒット ラウス マウス	HSANVYFON SSQGSYFICS SSQGSYFICS SSQGSYFICS	LSIFDPPPFK LSIFDPPPFQ LSIFDPPPFQ LSIFDPPPFQ	-VILIGGYLH EKNLSGGYL ERNLSGGYL E.NLSGGYLH	IYESQLCCQL IYESQLCCQL IYESQLCCQL IYESQLCCQL	KFWLPGCRA KFWLPGCRA KFWLPGCRA KFWLPGCRA	149 150 150 150
コンセンサス						
ヒット ラウス マウス	FWVCIIIGCI FVAALLEGCI FWVILLEGCI FWVILLEGCI	IIQWLTKKKY FIIMFATKKY FIIMFATKKY FIIMFATKKY	SSSVHDPNNE SSSVHDPNNE SSSVHDPNNE SSSVHDPNNE	YMFMAVNTA YMFMAVNTN YMFMAVNTN YMFMAVNTN	KKSRITDVTL KKSRILAGVTS KKSRILAGVTS KKSRILAGVTS	199 200 200 200
コンセンサス						

【書類名】 要約書

【要約】

【課題】 白血球のサブポピュレーション特異的に発現する新規な細胞接着分子を提供することを課題とする。

【解決手段】 ラットリンパ球系細胞株を免疫原としてマウスに投与し、モノクローナル抗体の単離を行い、免疫原細胞であるラットリンパ球系細胞を強く凝集させる特性を有するモノクローナル抗体、および該抗体によるラットリンパ球系細胞の凝集を強く阻害するモノクローナル抗体を取得した。また、種々の細胞において、得られた抗体が認識する分子の発現パターンの解析を行い、該分子が、静止期リンパ球には発現せず、胸腺細胞および活性化リンパ球細胞特異的に発現していることを見出した。さらに、糖鎖の消化解析によりこの分子が糖鎖修飾が異なるホモダイマー分子であることを見出した。また、細胞接着解析により該分子が接着分子であることを確認した。次いで、発現クローニング法を用いて該分子をコードするラット遺伝子をクローニングし、さらに、ブランクハイブリダイゼーションによりヒト遺伝子をクローニングした。塩基配列を決定しその解析を行ったところ、該分子が既知の接着分子とは有意な相同性のない全く新規の接着分子であることを見出した。

【選択図】 なし

特平 9-062290

【書類名】

職権訂正データ

【訂正書類】

特許願

<認定情報・付加情報>

【特許出願人】

【識別番号】

000004569

【住所又は居所】

東京都港区虎ノ門二丁目2番1号

【氏名又は名称】

日本たばこ産業株式会社

【代理人】

申請人

【識別番号】

100102978

【住所又は居所】

茨城県土浦市卸町1-1-1 関鉄つくばビル6階

清水国際特許事務所

【氏名又は名称】

清水 初志

特平 9-062290

出 願 人 履 歴 情 報

識別番号 [000004569]

1. 変更年月日 1995年 5月16日
[変更理由] 住所変更
住 所 東京都港区虎ノ門二丁目2番1号
氏 名 日本たばこ産業株式会社

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☒ **BLACK BORDERS**
- ☐ **IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES**
- ☒ **FADED TEXT OR DRAWING**
- ☒ **BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING**
- ☐ **SKewed/SLANTED IMAGES**
- ☐ **COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS**
- ☐ **GRAY SCALE DOCUMENTS**
- ☒ **LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT**
- ☐ **REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY**
- ☐ **OTHER:** _____

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.